

**Aus dem Med. Zentrum für Hygiene und Infektionsbiologie
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk
Institut für Virologie
Leiter: Prof. Dr. H.-D. Klenk**

**in Zusammenarbeit mit dem
Institut für klinische und molekulare Virologie
der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg
Leiter: Prof. Dr. B. Fleckenstein**

Identifizierung und Charakterisierung des HCMV Portal Proteins pUL104

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie**

**dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt**

**von
Alexandra Dittmer
aus Hamburg**

Marburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am: 12.10.2006

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. K. Radsak

Korreferent: Prof. Dr. J. Hoyer

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Taxonomie	1
1.2 Medizinische Aspekte.....	2
1.3 Aufbau des humanen Cytomegalievirus	4
1.3.1 Virionenstruktur.....	4
1.3.2 Aufbau des Genoms.....	5
1.4 Viraler Infektionszyklus	6
1.4.1 Virus-Eintritt.....	6
1.4.2 Genexpression.....	7
1.4.3 Morphogenese.....	7
1.5 HCMV DNA-Verpackung.....	8
2. Problemstellung	10
3. Material	11
3.1 Chemikalien.....	11
3.2 Enzyme	11
3.2.1 Restriktionsendonukleasen	11
3.2.2 Sonstige Enzyme	11
3.3 Kits.....	11
3.4 Antikörper.....	12
3.4.1 Monoklonale Antikörper	12
3.4.2 Polyklonale Antikörper.....	12
3.4.3 Sekundärantikörper.....	13
3.5 Medien	13
3.6 Puffer und Lösungen.....	14
3.7 Zellkulturen.....	16
3.7.1 Humane Vorhautfibroblasten (HFF).....	16
3.7.2 293T-Zellen	16
3.7.3 High five TM	16
3.8 Humanes Cytomegalievirus.....	16
3.9 Benzimidazol-D-Ribonukleoside	17
3.10 Bakterien.....	17
3.11 Plasmide.....	17
3.11.1 pcDNA3.1/HisA,B,C	17
3.11.2 pGEX-6P-1	18
3.11.3 pFastBAC TM HT A	19
3.11.4 pSIREN IRES-EGFP-RetroQ	20
3.11.5 pSIREN IRES-EGFP-RetroQ siLuci.....	20
3.11.6 pVSVG	21
3.11.7 pHIT60.....	21
3.11.8 pGEX-UL56C.....	21
3.11.9 pGEX-UL56N.....	21
3.11.10 pGEX-UL89	21
3.11.11 pcDNA-MCP	21
3.11.12 Cosmid pCM1028.....	21
3.12 Oligonukleotide	22

3.12.1	Klonierungsprimer	22
3.12.2	Sequenzierprimer	22
3.12.3	shRNA-Oligonukleotide	23
3.13	Geräte	23
4.	Methoden	25
4.1	Zellbiologische Methoden	25
4.1.1	Kultivierung von HFF- und 293T-Zellen	25
4.1.2	Kultivierung von Insektenzellen	25
4.1.3	Herstellung von Virusstocks und Virustitration	26
4.1.4	Experimentelle Virusinfektion	26
4.1.5	Transfektion von 293T-Zellen mittels Lipofectamine TM 2000	27
4.1.6	Gewinnung von Zellextrakten	27
4.1.7	Zellfraktionierung	28
4.1.8	Aufreinigung extrazellulärer Virionen	29
4.1.9	Herstellung rekombinanter Baculoviren	29
4.1.10	Herstellung rekombinanter Retroviren	29
4.2	Molekularbiologische Methoden	30
4.2.1	Plasmidpräparation aus Bakterien	30
4.2.1.1	<i>Minipräparation von Plasmid-DNA</i>	30
4.2.1.2	<i>Maxipräparation von Plasmid-DNA</i>	30
4.2.2	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in Lösung	31
4.2.3	Restriktion doppelsträngiger DNA mittels Endonukleasen	31
4.2.4	Dephosphorylierung linearisierter Plasmide	31
4.2.5	Aufreinigung von DNA aus Enzym-haltigen Ansätzen	31
4.2.6	Fällung von DNA	32
4.2.7	Ligationsreaktion	32
4.2.8	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	32
4.2.9	Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i>	33
4.2.9.1	<i>Herstellung kompetenter Bakterien</i>	33
4.2.9.2	<i>Hitzeschock -Transformation</i>	34
4.2.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
4.2.11	Asymmetrische PCR für automatische Sequenzierung	35
4.2.12	Pulsfeld-Gelelektrophorese	36
4.3	Immunologische Methoden	37
4.3.1	Affinitätsreinigung von Antikörpern mittels Affigel	37
4.3.2	Immunfluoreszenz	38
4.3.2.1	<i>Fixierung und Permeabilisierung von Zellen</i>	38
4.3.2.2	<i>Immunfluoreszenz von permeabilisierten Zellen</i>	38
4.3.3	Immunoblot	39
4.3.4	Imunpräzipitation (IP)	40
4.3.5	Co-Immunpräzipitation (Co-IP)	41
4.4	Proteinchemische Methoden	41
4.4.1	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)	41
4.4.2	Native Gelelektrophorese	43
4.4.3	Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	44
4.4.4	Aufreinigung von bakteriell exprimierten Proteinen	44
4.4.5	Aufreinigung von Baculovirus exprimierten Proteinen	45
4.4.6	<i>in vitro</i> Translation von Proteinen	46
4.4.7	Sedimentation von Proteinen über Sucrosegradienten	47

4.4.8	Crosslinking von Proteinen mit Glutaraldehyd	47
4.4.9	<i>in vitro</i> Protein-Bindungsexperimente.....	47
4.4.10	<i>in vitro</i> DNA-Bindungsexperimente.....	48
4.5	Elektronenmikroskopie.....	48
4.5.1	Einbettung von Zellen für die Elektronenmikroskopie	48
4.5.2	Immunoelektronenmikroskopische Analyse (IEM)	49
4.5.3	Negativkontrastierung von Einzelpartikeln	50
5.	Ergebnisse.....	51
5.1	Lokalisation von pUL104 in transient transfizierten 293T-Zellen	51
5.1.1	Klonierung von UL104 in pcDNA3.1HisC	51
5.1.2	Intrazelluläre Lokalisation von solitär exprimiertem pUL104	51
5.2	Untersuchungen zur Lokalisation des pUL104 NLS.....	52
5.2.1	Herstellung von pUL104 Deletionskonstrukten	53
5.2.2	Intrazelluläre Lokalisation der pUL104-Deletionsmutanten	53
5.3	Affinitätsreinigung von pUL104-Antikörpern	55
5.3.2	Affinitätsreinigung von anti-pUL104 Antikörpern	55
5.4	Analyse der Expression von pUL104 in infizierten Zellen	57
5.4.1	Identifikation der Genprodukte von ORF UL104	57
5.4.2	Subzelluläre Verteilung von pUL104.....	58
5.4.3	Nachweis von pUL104 in Virionen.....	59
5.4.4	EM-Analyse der pUL104 Lokalisation in infizierten Zellen	60
5.4.5	Lokalisation von pUL104 im Infektionsverlauf	60
5.5	Untersuchungen zur Struktur von pUL104.....	63
5.5.1	Größenbestimmung von pUL104 über Sedimentation	63
5.5.2	Expression von rpUL104 über Baculoviren	64
5.5.3	Analyse von rpUL104 in der Gelpermeations-Chromatographie.....	65
5.5.4	Cross-Linking Analyse von rpUL104	67
5.5.5	Einzelpartikelanalyse von rpUL104	67
5.6	Interaktion von pUL104 mit Verpackungsproteinen.....	68
5.6.1	Co-Lokalisation von pUL104 mit Verpackungsproteinen	68
5.6.2	<i>in vitro</i> Interaktionsanalyse von pUL104 und der HCMV Terminase	70
5.6.3	Untersuchung der <i>in vitro</i> Bindung von pUL104 an DNA.....	71
5.7	Einfluss von Benzimidazol-D-Ribonukleosiden auf die DNA-Verpackung	72
5.7.1	Inhibition der pUL104-pUL56 Interaktion durch Benzimidazol-D-Ribonukleoside	72
5.7.2	Analyse des Effekts von Cl ₄ RB auf in infizierte Zellen	74
5.7.3	Analyse der DNA-Prozessierung bei Cl ₄ RB-Behandlung.....	75
5.8	Inhibition der pUL104-Expression über RNA-Interferenz.....	76
5.8.1	Klonierung von UL104-shRNAs in pSIREN-IRES-EGFP-RetroQ	76
5.8.2	Überprüfung der pUL104-Expression bei transienter shRNA Expression in 293T-Zellen	77
5.8.3	Etablierung stabil shRNA-exprimierender HFF-Zelllinien über retrovirale Transduktion	78
5.8.4	Überprüfung der pUL104-Expression nach HCMV-Infektion von shRNA-exprimierenden HFF.....	78
5.8.5	Analyse der viralen Replikationseffizienz in pUL104 reprimierten Zellen	80
5.8.6	Analyse der Virusfreisetzung in pUL104 reprimierten Zellen	81

5.8.7	EM-Analyse des Replikationsblocks in pUL104 reprimierten Zellen	82
6.	Diskussion	84
6.1	Subzelluläre Verteilung von pUL104	84
6.2	Struktur von pUL104	86
6.3	Rolle von pUL104 in der DNA-Verpackung	88
6.4	pUL104 als Ansatzpunkt für die antivirale Therapie	89
7.	Zusammenfassung	92
8.	Literaturverzeichnis	94
9.	Anhang	108
9.1	Abkürzungen	108
9.2	Basenpaar-Sequenz des ORF UL104	110
9.3	Aminosäure-Vergleich von pUL104 mit HSV-1 pUL6	111
	Danksagung	112

1. Einleitung

1.1 Taxonomie

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) gehört zur Familie der Herpesviridae (Roizmann et al., 1992). Wie alle Herpesviren besitzt es ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom, umgeben von einem ikosaedrischen Kapsid, einer Proteinmatrix, die als Tegument bezeichnet wird, sowie einer Hüllmembran, in die eine Vielzahl viraler Glykoproteine (gp) inseriert sind. Die Replikation der DNA und die Formation der Nukleokapside erfolgen im Zellkern.

Alle Herpesviren können nach einer Erstinfektion latent im Wirtsorganismus verbleiben, wobei die Viren in Nerven- oder lymphatischen Zellen persistieren, ohne dass damit eine Produktion infektiöser Partikel verbunden ist.

Die Einteilung der Herpesviridae beruht auf der Klassifikation durch die *Herpesvirus Study Group* des Internationalen Komitees für Virustaxonomie (International Committee on Taxonomy of Viruses, ITCV). Aufgrund ihrer Pathogenität, ihres Wirtszelltropismus und ihrer genetischen Eigenschaften (Konservierung von Gengruppen, genomische Organisation, Sequenzhomologien) lassen sie sich in drei Unterfamilien einteilen; α -, β - und γ -Herpesvirinae. Tab. 1.1 zeigt die Zuordnung der humanpathogenen Spezies.

Unterfamilie	Art	Kurzbezeichnung
α -Herpesvirinae	Humanes-Herpesvirus 1 (Herpes simplex 1)	HHV 1 (HSV-1)
	Humanes-Herpesvirus 2 (Herpes simplex 2)	HHV 2 (HSV-2)
	Humanes-Herpesvirus 3 (Varizella-Zoster-Virus)	HHV 3 (VZV)
β - Herpesvirinae	Humanes-Herpesvirus 5 (Humanes Cytomegalievirus)	HHV 5 (HCMV)
	Humanes-Herpesvirus 6	HHV 6
	Humanes-Herpesvirus 7	HHV 7
γ -Herpesvirinae	Humanes-Herpesvirus 4 (Epstein-Barr-Virus)	HHV 4 (EBV)
	Humanes-Herpesvirus 8 (Kaposi Sarcoma-assoziiertes Herpesvirus)	HHV 8 (KSHV)

Tab. 1.1: Taxonomische Einordnung der humanpathogenen Herpesviren. Nach Chang et al., 1994; Roizmann et al., 1992; Epstein et al., 1965; Frenkel et al., 1990; Josephs et al., 1986; Schneeweis et al., 1962; Smith, 1956

Die α -**Herpesvirinae**, wie die Herpes simplex Viren und das Varizella-Zoster Virus, zeichnen sich durch ein breites Wirtsspektrum aus. Sie besitzen *in vitro* einen kurzen Replikationszyklus (24 h) und sind in Zellkultur zytolytisch. *In vivo* weisen sie einen Neurotropismus auf.

Die β -**Herpesvirinae**, zu denen das HCMV gehört, haben eine ausgeprägte Spezies- und Zelltypspezifität. Sie haben einen langen Vermehrungszyklus von 72 h oder mehr und sind ebenfalls zytolytisch. Ein weiteres Merkmal ist der zytopathische Effekt der Virusinfektion, der durch Bildung von intranukleären und intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen zu einer deutlichen Vergrößerung infizierter Zellen führt, die man als „Cytomegalie“ bezeichnet. Vertreter dieser Unterfamilie sind primär lymphotrop, aber in der Lage, unterschiedliche Gewebe wie z.B. das Retikuloendotheliale System und die Niere zu infizieren und dort zu persistieren.

Die γ -**Herpesvirinae**, wie das Epstein-Barr-Virus, weisen ebenfalls ein enges Wirtsspektrum auf, die Dauer des Replikationszyklus ist allerdings bei den verschiedenen Virustypen unterschiedlich. Sie infizieren überwiegend B- und T-Lymphozyten. Darüber hinaus zeichnen sie sich durch ihr onkogenes Potential aus.

1.2 Medizinische Aspekte

Das humane Cytomegalievirus ist mit unterschiedlicher Durchseuchungsrate auf der ganzen Welt verbreitet. In Industrieländern sind 20-25% der Jugendlichen seropositiv (Alford und Britt, 1990), in Entwicklungsländern hingegen beträgt die Durchseuchungsrate bei Kindern bereits in den ersten Lebensjahren bis zu 90% (Bello and Wittle, 1991). Die Durchseuchung der erwachsenen Bevölkerung von nahezu 100% in Entwicklungsländern und ca. 40% in Industrieländern verdeutlicht die Relevanz des humanen Cytomegalievirus als weltweit verbreiteten pathogenen Krankheitserreger (Pass, 2001).

Die Übertragung erfolgt über Tröpfchen- oder Kontaktinfektion, bei Säuglingen häufig über die Muttermilch, weiterhin über Bluttransfusionen oder Transplantationen. Außerdem stellt der Sexualverkehr einen wichtigen Ansteckungsmodus dar, da man das Virus neben Speichel sowohl in Urin und Cervixsekret, als auch in der Samenflüssigkeit nachweisen kann. Von großer

klinischer Bedeutung ist die Übertragung von der Mutter auf das ungeborene Kind *in utero*. Sie kann die Folge einer Primärinfektion der Mutter sein, die bei ca. 40% der Fälle zur Übertragung führt (Eggers et al., 2001), oder bei einer Reaktivierung des Virus während der Schwangerschaft erfolgen. Etwa 1-2% aller Neugeborenen sind bei der Geburt infiziert. Von den infizierten Säuglingen weisen ca. 10% Symptome wie Wachstumsstörungen, Hepatosplenomegalie, Gelbsucht, Mikrozephalie und Chorioretinitis auf (Demmler, 1991), weitere 10% sind von Spätschäden betroffen. Hierzu gehören Schwerhörigkeit oder sogar Taubheit, sowie weitere zentralnervöse Schädigungen (Britt et al., 1991; Revello et al., 2002).

Die Primärinfektion immunkompetenter Personen verläuft zumeist inapparent und führt zu einer lebenslangen Persistenz des Virus im Körper, bei der es mitunter zu symptomlosen Reaktivierungen kommt. In seltenen Fällen treten Symptome auf, die Fieber, Muskelschmerzen und ein Mononukleose-ähnliches Krankheitsbild beinhalten können (Klemola, 1973; Cohen and Corey, 1985).

Bei einer Immunsuppression kann die HCMV-Infektion mit schweren Krankheitssymptomen einhergehen, die Reaktivierung des Virus aus der Latenz wird in diesem Fall sehr häufig beobachtet. Besonders nach Organtransplantationen oder bei Immundefizienz infektiösen Ursprungs, z.B. aufgrund einer HIV-Infektion, können Patienten Krankheitsbilder wie Retinitis oder Ösophagitis entwickeln, aber auch lebensbedrohliche Pneumonien, Hepatitiden oder Enzephalitiden erleiden (Balfour, 1979; Roshani et al., 2005; Cheung and Teich, 1999).

Zur Therapie werden momentan die Nukleosidanaloga Ganciclovir (Crumpacker, 1996), Valganciclovir (Curran and Noble, 2001) und Cidofovir (Hitchcock et al., 1996), sowie das Pyrophosphat Analog Foscarnet (PFA; Chrisp and Clissold, 1991) verwendet, die die virale DNA-Synthese inhibieren. Nachteile beim Einsatz dieser Chemotherapeutika sind zum einen die Nebenwirkungen, die durch Knochenmarks- oder Nephrotoxizität ausgelöst werden (Curran and Noble, 2001; Deray et al., 1989), zum anderen besteht die Gefahr der Selektion resistenter Virusmutanten (Lurain et al., 1994; Erice, 1999). Eine Reihe von potenziell antiviralen Substanzen befinden sich zur Zeit in der Entwicklung, wie z.B. Maribavir (1263W94), ein L-ribosyl Benzimidazole, das neben der DNA-Synthese auch die Virus-Ausschleusung inhibiert (Biron et al., 2002). Maribavir hat die Phase I der klinischen Tests erfolgreich bestanden (Lalezari et al., 2002) und befindet sich inzwischen in der Phase II (Biron, 2006).

Eine Immunprophylaxe steht zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung. Die Laborstämme Towne und AD169 wurden bereits auf ihre Verwendung als attenuierte Lebendimpfstoffe getestet, konnten aber keinen effizienten Schutz gegen Wildtyp-Stämme induzieren. Strategien zur Impfstoffherstellung beinhalten die Entwicklung von modularen Impfstoffen mit definierten molekularen immunogenen Bausteinen, die Virusglykoproteine wie das Glykoproteins B (gB) enthalten, Pockenvirus- und Plasmid-DNA-Vektoren mit inserierten HCMV-Genen, Peptid-Vakzine, sowie weitere Versuche mit attenuierten Lebendimpfstoffen (Schleiss and Heinemann, 2005).

1.3 Aufbau des humanen Cytomegalievirus

1.3.1 Virionenstruktur

Die HCMV Virionen haben einen Durchmesser von 150 – 200 nm, wobei die Schwankungen durch die unterschiedliche Ausprägung des Teguments bewirkt werden. Das doppelsträngige, lineare DNA-Genom ist mit einer fibrillären Proteinmatrix zu einem sogenannten *core* organisiert (Wright et al., 1964). Dieses *core* wird von einem ikosaedrischen Kapsid von 100 nm Durchmesser umgeben, das aus 162 Kapsomeren besteht. In die Hüllmembran sind mehrere virale Glykoproteine eingelagert, die in Komplexen assoziiert sind. Der Glykoproteinkomplex I ist ein Homodimer des dominanten Glykoproteins gB (Britt, 1984; Britt and Auger, 1985). Der Glykoproteinkomplex II besteht aus den Glykoproteinen M und N (gM, gN; Mach et al., 2000) und der Glykoproteinkomplex III aus den Glykoproteinen H, L und O (gH, gL, gO; Huber and Compton, 1998; Li et al., 1997). Diese Komplexe sind an der Adsorption des Virus, der Fusion zwischen Virus- und Plasmamembran sowie der Zell-Zell-Fusion und außerdem im infizierten Organismus an der Induktion neutralisierender Antikörper beteiligt. Zwischen Kapsid und Hüllmembran des Virus befindet sich das Tegument, dem bis jetzt etwa 20 Proteine zugeordnet werden konnten. Die Funktionen der hier eingelagerten Proteine beinhalten eine Beteiligung an der Morphogenese (Baxter and Gibson, 2001; Meyer et al., 1997), Virus-Transport (Sinzger et al., 2000), Immunmodulation (Brown and Shenk, 2003; Child et al., 2004) sowie der Regulation der Genexpression in der sehr frühen Phase durch Transaktivierung (Liu and Stinski, 1992; Winkler et al., 1995).

Neben infektiösen Virionen werden auch nicht-infektiöse Partikel gebildet, zum einen *dense bodies*, die nur aus Membran und Tegumentproteinen bestehen, zum anderen *non-infectious enveloped particles*, die zwar das Nucleocapsid enthalten, aber keine DNA (Sarov and Abady, 1975; Irmieri and Gibson, 1983; Gibson, 1996).

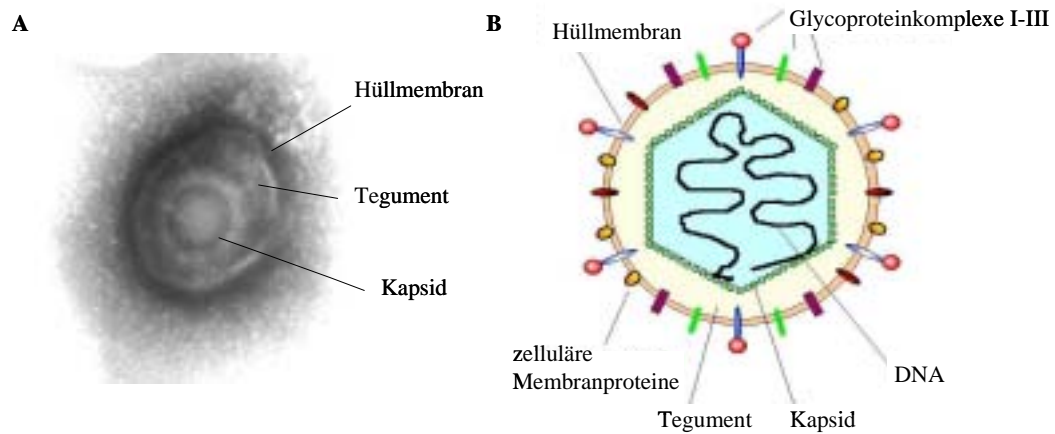


Abb. 1.1: (A) Elektronenmikroskopische und (B) schematische Darstellung des humanen Cytomegalievirus

1.3.2 Aufbau des Genoms

Das Genom des HCMV besitzt mit ca. 230 kb und einem Molekulargewicht von $1,5 \times 10^8$ Dalton (Chee et al., 1990; Bankier et al., 1991) die größte Kodierungskapazität innerhalb der Familie der Herpesviridae. Es besteht aus zwei nicht repetitiven Bereichen, dem *unique long* (UL)- und dem *unique short* (US)-Segment, die von repetitiven Sequenzen flankiert werden, den *terminal* (TR_L, TR_S) und *internal repeats* (IR_L, IR_S; s. Abb. 1.2).

Entsprechend der Nomenklatur dieser Genomabschnitte werden die Gene mit den Präfixen TR, IR, UL oder US bezeichnet. Durch intramolekulare Rekombination der identischen invertierten Wiederholungseinheiten (ab – b'a' sowie a'c – c'a) können 4 isomere Formen des Genoms entstehen, die in äquimolarem Verhältnis in allen HCMV-Populationen vorkommen (Stinski et al., 1981; Dutch et al., 1992). Der HCMV-Laborstamm AD169 wurde vollständig sequenziert, er besitzt 208 offene Leserahmen (ORF; Chee et al., 1990). Mindestens 19 weitere ORFs, UL133-151, finden sich im UL-b` Bereich des Genoms in verschiedenen anderen HCMV-Stämmen und werden für Pathogenität und Zelltropismus mitverantwortlich gemacht (Cha et al., 1996; McCormac and Grundy, 1999).

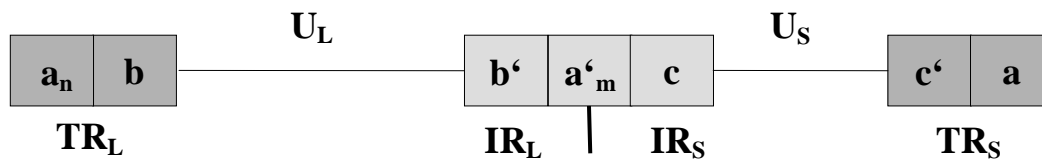


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Genomorganisation des HCMV. Das Genom des HCMV besteht aus zwei nicht repetitiven Segmenten, dem U_L (*unique long*)- und dem U_S (*unique short*)-Segment, die an den Enden von repetitiven Sequenzen, den *terminal repeats* (TR) und den *internal repeats* (IR) flankiert werden. Die Bezeichnungen a_n , a'_m und a (b und b' ; c und c') stellen identische Basenabfolgen dar, die invertiert zueinander vorliegen.

1.4 Viraler Infektionszyklus

1.4.1 Virus-Eintritt

Das HCMV ist strikt speziesspezifisch und weist in permissiven Zellen einen längeren Infektionszyklus (72 h) auf als andere Vertreter dieser Familie. Da das Virus ein breites Spektrum an Zelltypen infizieren kann, wird vermutet, dass HCMV mehrere unterschiedliche Rezeptoren oder ubiquitär verteilte Oberflächenmoleküle verwendet. Hierbei wird unter anderem der *epidermal growth factor receptor* EGFR diskutiert, sowie Integrin $\alpha v \beta 3$ als Corezeptor (Wang et al., 2003; Wang et al., 2005). Zunächst vermittelt gB den Kontakt zur Wirtszelle über unspezifische Bindungen an Heparansulfatproteoglykane (Compton et al., 1993; Boyle and Compton, 1998). Diese Absorption wird zusätzlich über wirtseigenes β_2 -Mikroglobulin unterstützt (Grundy et al., 1987). Nach Bindung des gB an den Wirtszellrezeptor und pH-unabhängiger Fusion der Zellmembran und der Virushülle über *coiled-coil*-Domänen von gB und gH (Reschke et al., 1995; Bold et al., 1996; Lopper and Compton, 2004) werden Kapsid und Tegument in das Zytoplasma der Zelle geschleust. In der Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) Infektion konnte eine Interaktion des Tegumentproteins US11 mit Kinesin, sowie eine Funktion von Dynein und Dynactin im Mikrotubuli vermittelten Transport zum Zellkern nachgewiesen werden (Sodeik et al., 1997; Diefenbach et al., 2002; Dohner et al., 2002). An der Kernpore wird das virale Genom ins Nukleoplasma entlassen, wo es zirkularisiert (Ojala et al., 2000). Da inzwischen auch eine Assoziation zwischen HCMV Kapsiden und dem Mikrotubuli-Netzwerk in der *post-entry*-Phase gezeigt wurde (Ogawa-Goto et al., 2003), ist hier ein ähnlicher Mechanismus zu vermuten.

1.4.2 Genexpression

Im Kern erfolgt die Expression des viralen Genoms kaskadenartig unter Mitwirkung einer Vielzahl zellulärer Transkriptionsfaktoren (Wathen and Stinski, 1982). In den ersten 3 Stunden der Infektion wird zunächst die Expression der α - oder sehr frühen Gene (*immediate early*) des Virus durch die zelluläre RNA-Polymerase II eingeleitet. Unterstützend wirken dabei virale Tegumentproteine wie pp71 und pUL69, die als Transaktivatoren fungieren (Winkler et al., 1995). Die Proteine dieser Phase dienen zur Regulation der Expression der β - oder frühen Gene (*early*; Spaete and Mokarski, 1985b; Geballe et al., 1986), deren Produkte für die Einleitung der viralen Replikation notwendig sind, sowie zur Regulierung der γ - oder späten Gene (*late*), die für die viralen Strukturproteine kodieren. Die frühe Phase umfasst den Zeitraum von 3-36 h post Infektion (p.i.). Während dieser Phase wird der größte Teil der viralen Gene transkribiert und die Synthese von Nichtstrukturproteinen zur Replikation, wie z.B. der viralen DNA-Polymerase, und teilweise auch von Strukturproteinen eingeleitet. Die Replikation des Genoms erfolgt nach dem *rolling circle*-Prinzip (Huang, 1975; Stinski et al., 1983) in bestimmten Bereichen des Kerns, die als Replikationszentren bezeichnet werden (de Bruyn Kops et al., 1994 und 1998). Der dabei gebildete lineare DNA-Strang enthält vielfache Einheiten des Virusgenoms, sogenannte Konkatemere.

Die Expression der späten Gene beginnt mit der DNA-Synthese. Hierbei kommt es zur hauptsächlichen Synthese der strukturellen Kapsid-, Tegument- und Membranproteine.

1.4.3 Morphogenese

Die Morphogenese der Viruspartikel findet ebenfalls im Kern der Wirtszelle statt. Zunächst gelangen Komplexe bestehend aus dem *assembly protein precursor* (pAP), dem *proteinase precursor* (pPR) und dem *major capsid protein* (MCP) in den Zellkern und bilden das Prokapsid, das dann durch Anheftung der Triplex-Untereinheiten komplettiert wird (Gibson, 2001). Durch Angularisierung des Kapsid wird die B-Kapsidform gebildet. Das pAP wird bei der DNA-Verpackung durch die inzwischen aktive Proteinase gespalten, wobei entweder DNA-haltige C-Kapside oder bei abortiver DNA-Verpackung leere A-Kapside gebildet werden (Welch et al., 1991).

Die reifen Kapside interagieren mit einer Reihe von Tegumentproteinen, hauptsächlich den Phosphoproteinen pp150, pp71 und pp65. Über deren Interaktion mit viralen Glykoproteinen, die in der inneren Kernmembran nachweisbar sind (Radsak et al., 1990; Bogner et al., 1992; Meyer and Radsak, 2000), folgt eine erste Knospung an der inneren Kernmembran. Dies wird durch eine Destabilisierung der Kernlamina durch virale Kinasen wie pUL97 erleichtert (Radsak et al., 1991; Krosky et al., 2003). Nach Durchwanderung der perinukleären Zisterne gelangen die Partikel nach Fusion der temporären Hülle mit der äußeren Kernmembran unumhüllt ins Zytoplasma (Radsak et al., 1995). Es erfolgt die Anlagerung weiterer Tegumentproteine und die endgültige Umhüllung der Kapside an Zisternen des tubulären Endosoms oder des Trans-Golgi-Netzwerks, in deren Membranen virale Glykoproteine inseriert sind (Tooze et al., 1993; Radsak et al., 1996). Die reifen Viruspartikel werden schließlich über Exocytose aus der Zelle entlassen.

1.5 HCMV DNA-Verpackung

Die DNA-Verpackung folgt bei allen Mitgliedern der Herpesvirus-Familie sowie bei vielen doppelsträngigen DNA Bakteriophagen, den *Caudovirales*, die auch im Kapsidaufbau Ähnlichkeiten zu den Herpesviren zeigen und vermutlich gemeinsame Vorfahren aufweisen (Baker et al., 2005), dem gleichen Mechanismus. Während der Replikation entsteht konkatemere DNA, die durch die virale Terminase in einzelne Genomeinheiten gespalten und unter ATP-Verbrauch in vorgefertigte Kapside verpackt wird. Die viralen Terminasen liegen in der Regel als Heterodimer vor, wobei jede Untereinheit für unterschiedliche Funktionen zuständig ist (Black, 1998). Sieben virale Genprodukte (UL104, UL93, UL89, UL77, UL56, UL52 und UL51) konnten als notwendig für die virale DNA Spaltung und Verpackung durch Homologie mit Bakteriophagen und Herpes-Simplex-Virus Genen identifiziert werden (Chee et al., 1990). Die Proteine pUL56 und pUL89 bilden dabei gemeinsam die HCMV Terminase. Die große Terminase-Untereinheit, pUL56 (Bogner et al., 1993), bindet spezifisch an im HCMV-Genom enthaltene Verpackungssequenzen (Bogner et al., 1998). Diese sogenannten *a* Sequenzen finden sich an beiden Genomenden und in umgekehrter Orientierung an der L-S Verknüpfung. Sie enthalten zwei kurze konservierte Sequenz-Motive, *pac 1* und *pac 2*, die für die

DNA-Spaltung und Verpackung notwendig sind (Spaete and Mocarski, 1985). Weiterhin interagiert pUL56 mit dem HCMV Kapsid (Scheffczik et al., 2002) und verfügt über eine APTase-Aktivität (Hwang and Bogner, 2002; Scholz et al., 2003). Durch die Nuclease-Aktivität der kleinen Terminase-Untereinheit pUL89 wird die DNA gespalten (Scheffczik et al., 2002). Die Wirksamkeit der Benzimidazol-D-Ribonucleoside TCRB and BDCRB, die starke Inhibitoren der HCMV Replikation sind, läßt sich auf Inhibition der Terminase-Aktivität zurückführen (Krosky et al., 1998; Scholz et al., 2003).

Der Translokationsschritt der DNA in das Kapsid, über den bei HCMV noch nichts bekannt ist, erfolgt bei den Bakteriophagen und HSV-1 über Interaktion der Terminase mit einem Portal- oder *connector*-Protein, das an einem Kapsidvertex einen Kanal für den Eintritt der DNA bildet und dabei vermutlich ein Penton ersetzt (Jiang et al., 2006; Trus et al., 2004). Es handelt sich in allen Fällen um ein Dodecamer in Trichterform mit einer Größe von 35,9 kDa (Bakteriophage Phi29; Guasch et al., 2002) bis 82,7 kDa (Bakteriophage p22; Bazinet et al., 1988) für das Monomer. Das Portalprotein bildet zusammen mit der Terminase einen molekularen Motor. Die DNA wird mit hoher Prozessivität gegen einen wachsenden internen Widerstand, der durch die Kondensierung der eingeschleusten DNA entsteht, verpackt; im Fall von Phi29 entstehen dabei Kräfte von bis zu 57 pN (Smith et al., 2001). Dieser Schritt erfordert einen hohen Energieaufwand. Unter *in vitro* Bedingungen wird für die Translokation von zwei Basenpaaren die Hydrolyse eines ATP-Moleküls benötigt (Guo et al., 1987; Schibata et al., 1987). Der Mechanismus dieser Translokation ist noch nicht vollständig aufgeklärt, aber es wird postuliert, daß die Unstimmigkeit zwischen der 5-fach Symmetrie des Kapsids und der 12-fach Symmetrie des Portals eine ATP-gekoppelte Rotation des Portalproteins ermöglicht, welche die DNA in das Kapsid eindreht (Simpson et al., 2000).

Ein zweiter Schnitt der DNA zum Abschluß der Verpackung erfolgt entweder sequenzspezifisch, u.a. bei den Phagen Lambda, T3 und T7 (Catalano et al., 1995; Fujisawa and Morita, 1997), oder nach dem *head-full*-Mechanismus, wenn eine bestimmte Menge an DNA verpackt wurde (u.a. P1, P22, T1, T4, SPP1; Black, 1998; Tavares et al., 1996). Das Kapsid wird bei Bakteriophagen im Anschluß durch Anbau des Phagenschwanzes verschlossen, was einen Austritt der DNA verhindert. Wodurch bei den Herpesviren ein vorzeitiger Verlust der DNA verhindert wird, ist noch unbekannt.

2. Problemstellung

Während es über die HCMV Terminase schon zahlreiche Erkenntnisse gibt, ist über das HCMV Portalprotein, einem weiteren wichtigen Bestandteil der DNA Verpackungsmaschinerie, noch nichts bekannt.

Allerdings konnte vor kurzem pUL6 als das Portalprotein des Herpes-Simplex-Virus Typ 1 identifiziert werden (Newcomb et al., 2001). Es handelt sich wie alle bisher untersuchten Portalproteine um ein Kapsid-assoziiertes Dodecamer, das mit der HSV-1 Terminase interagiert (White et al., 2003).

Das HCMV Homolog zu dem HSV ORF UL6 ist der ORF UL104. Das Protein pUL104 ist für die HCMV Replikation essentiell (Yu et al., 2003) und gehört mit pUL6 zu einer Gruppe von Proteinen, die innerhalb der Herpesviren stark konserviert sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß bei TCRB und BDCRB resistenten Virusmutanten, die Mutationen in UL56 und UL89 aufweisen, auch eine Mutation in UL104 auftritt, die möglicherweise einen kompensatorischen Effekt hat (Komazin et al., 2004).

Der ORF UL104 enthält 2094 Basenpaare, was auf ein Protein mit 698 Aminosäuren und einem theoretischen Molekulargewicht von ca. 75 kDa schließen läßt. Er befindet sich an Position 50004-52098 des AD169 Genoms und überlappt mit den UL103 und UL105 Leserahmen.

In der vorliegenden Arbeit soll das UL104 Genprodukt identifiziert und charakterisiert werden. Weiterhin soll die Hypothese, das es sich um das HCMV Portalprotein handelt, durch strukturelle und funktionale Untersuchungen überprüft werden. Dazu soll ein polyklonales anti-pUL104 Antiserum aufgereinigt und damit die Expression und Lokalisation von pUL104 im viralen Kontext überprüft werden, ebenso wie die Interaktion mit der HCMV Terminase und der Effekt von Benzimidazol-D-Ribonucleosiden auf pUL104. Außerdem soll über rekombinant exprimiertes rpUL104 die Oligomerisierung des Proteins untersucht und Einzelpartikel-Analysen durchgeführt werden. Weiterhin soll die pUL104 Expression spezifisch über den Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) reprimiert werden, um anschließend durch Infektionsexperimente Einblick in die Bedeutung dieses Proteins für die HCMV-Replikation zu erhalten.

3. Material

3.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von den Firmen Roche (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Steinheim), Fluka Chemie GmbH (Buchs) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

3.2 Enzyme

3.2.1 Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs (NEB), Frankfurt, und Fermentas, St. Leon-Rot, bezogen und den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt.

3.2.2 Sonstige Enzyme

Alkalische Phosphatase	Fermentas, St. Leon-Rot
DNAseI	Roche, Mannheim
PreScission Protease TM	Amersham Biosciences, Freiburg
Proteinase K	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
Vent DNA Polymerase	NEB, Frankfurt

3.3 Kits

Big-Dye-Sequenzier-Kit	ABI, Weiterstadt
NucleoSpin Extract II Kit	Machery-Nagel, Düren
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
TNT-T7 Quick	Promega, Mannheim

3.4 Antikörper

3.4.1 Monoklonale Antikörper

anti-XpressTM Antikörper: Maus-Antikörper gegen das Xpress-Epitop gerichtet (Invitrogen, Karlsruhe). Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz 1:50 verdünnt verwendet.

anti- β Aktin-Antikörper: Maus-anti-Aktin Antikörper (Klon C15; Sigma-Aldrich, Steinheim). Der Antikörper wurde im Westernblot 1:5000 verdünnt verwendet.

mAb27-156: Maus-anti-gB Antikörper, bezogen von W. Britt, University of Alabama. Der Antikörper wurde im Westernblot 1:10 verdünnt verwendet.

mAb28-4: Maus-anti-MCP Antikörper, bezogen von W. Britt, University of Alabama. Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz 1:10 verdünnt verwendet.

mAb58-15

Maus-anti-pp65 Antikörper bezogen von W. Britt, University of Alabama. Der Antikörper wurde im Westernblot 1:10 verdünnt verwendet.

mAb63-27: Maus-anti-IE1 Antikörper, bezogen von T. Stamminger, Universität Erlangen-Nürnberg (Andreoni et al., 1989). Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz 1:10 verdünnt verwendet.

mAbM23: Maus-anti-pUL112/113 Antikörper, bezogen von K. Radsak, Universität Marburg (Yamamoto et al., 1998). Der Antikörper wurde unverdünnt verwendet.

RG1202: Maus-anti-pUL44 Antikörper, bezogen von A. Ripalti, Universität Bologna. Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz 1:10 verdünnt verwendet.

3.4.2 Polyklonale Antikörper

Humanes HCMV-positives Serum: IgG-positives Patientenserum wurde nach Testung auf HCMV-Titer von der Diagnostik des Instituts für klinische und molekulare Virologie, Universität Erlangen-Nürnberg, zur Verfügung gestellt.

pAbgH: Human-anti-gH Antiserum, bezogen von K. Radsak, Universität Marburg (Bogner et al., 1992). Der Antikörper wurde im Westernblot 1:10 verdünnt verwendet.

pAbUL56: Human-anti-pUL56 Antiserum (Giesen et al, 2000a). Der Antikörper wurde im Westernblot, in der Immunfluoreszenz und für Co-Immunpräzipitationen 1:10 verdünnt.

3.4.3 Sekundärantikörper

Alle verwendeten Sekundärantikörper wurden von der Firma Dianova, Hamburg, bezogen.

Einsatz in der Immunfluoreszenz:

Anti-Human F(ab')₂ Fragmente, CyTM3 konjugiert (1:400 verdünnt)

Anti-Human IgG (H+L) aus der Ziege, unkonjugiert (1:10 verdünnt)

Anti-Maus F(ab')₂ Fragmente, CyTM2 konjugiert (1:200 verdünnt)

Anti-Ziege F(ab')₂ Fragmente, FITC konjugiert (1:200 verdünnt)

Einsatz in der Immunogold-Färbung:

Anti-Human IgG (H+L), 12 nm kolloidales Gold-konjugiert (1:40 verdünnt)

Anti-Maus IgG (H+L), 4 nm kolloidales Gold-konjugiert (1:40 verdünnt)

Einsatz im Westernblot:

Anti-Human IgG F(ab')₂ Fragmente, HRP-konjugiert, (1:10000 verdünnt)

Anti-Maus IgG (H+L), HRP-konjugiert, (1:10000 verdünnt)

3.5 Medien

LB-Medium (Luria-Bertani Broth)

Bacto-Hefe-Extrakt	0,50 % (w/v)
Bacto-Trypton	1,00 % (w/v)
NaCl	1,00 % (w/v)
MgSO ₄ /5 H ₂ O	0,25 % (w/v)
<i>aqua dest</i>	

LB-Agarplatten

LB-Medium + 1,5% (w/v) Bacto-Agar in 10 cm Schalen

LB-Amp

LB-Medium + 0,1 µg/ml Ampicillin

LB-Tet

LB-Medium + 10 µg/ml Tetracyclin

DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)

Das Medium für eukaryotische Zellen besteht aus einer physiologischen Zusammensetzung von Vitaminen, Aminosäuren, anorganischen Salzen und Glukose sowie dem pH-Indikator Phenolrot. Es wurde als Festsubstanz von Gibco/BRL (Karlsruhe) bezogen, in sterilem Wasser gelöst und mittels NaOH auf einen pH von 7,0 eingestellt. Für die Zellkultur wurde das Medium mit 10% (v/v) Fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM Glutamin, Penicillin (5 U/ml) und Streptomycin (50 µg/ml) supplementiert.

TC-100

Das Medium für Insekten-Zellen wurde von PAN Biotech, Aidenbach, bezogen. Für die Zellkultur wurde das Medium mit 10% (v/v) FCS, 2 mM Glutamine und Gentamycin (60 µg/ml) supplementiert.

3.6 Puffer und Lösungen**Co-IP-Puffer pH 7,5 (für Co-Immunpräzipitationen)**

Tris/HCl	20 mM
Natriumchlorid	100 mM
EDTA	5 mM
Natriumdesoxycholat	0,4% (v/v)
Tween-20	0,5% (v/v)
Iodacetamid	25 mM
<i>aqua dest</i>	

6x DNA-Auftragspuffer

Glycerol	30% (w/v)
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Xylencyanol	0,25% (w/v)
<i>aqua dest</i>	

IP-Puffer pH 7,5 (für Immunpräzipitationen)

Tris/HCl	50 mM
Natriumchlorid	100 mM
BSA	0,2% (v/v)
Natriumdesoxycholat	1% (v/v)
Tween-20	0,5% (v/v)
<i>aqua dest</i>	

PBSO (Phosphat gepufferte Salzlösung ohne CaCl₂ und MgCl₂) pH 7,4

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
KH ₂ PO ₄	1.4 mM
Na ₂ HPO ₄	100 mM
<i>aqua dest</i>	

PBSO/0,1% Tween

0,1% (v/v) Tween20 in PBSO

PBS

PBSO mit 100 mM CaCl₂, 100 mM MgCl₂

4x SDS-PAGE Probenpuffer pH 6,8 (4xPP)

Tris/HCL	200 mM
β-Mercaptoethanol	4% (v/v)
SDS	4% (w/v)
Glycerin	40% (v/v)
Bromphenolblau	0.01% (w/v)
<i>aqua dest</i>	

TBE-Puffer (10x)

Tris	900 mM
Borsäure	900 mM
EDTA	10 mM
<i>aqua dest</i>	

Trypsin/EDTA pH 7,0

NaCl	140 mM
KCl	5 mM
Na ₂ HPO ₄	0,56 mM
D(+)-Glucose	5 mM
Tris/HCL	5 mM
EDTA in 0,25%iger Trypsin-Lösung <i>aqua dest</i>	0,01% (v/v)

3.7 Zellkulturen**3.7.1 Humane Vorhautfibroblasten (HFF)**

Primäre humane Vorhautfibroblasten, die aus Vorhautgewebe von Neugeborenen und Kleinkindern isoliert wurden.

3.7.2 293T-Zellen

Humane embryonale Nierenepithelzellen, die durch Adenovirus Typ 5 stabil transformiert wurden, und zusätzlich die kodierenden Sequenzen für das SV40 T-Antigen (in das Genom integriert) enthalten (Pear et al., 1993).

3.7.3 High fiveTM

Insektenzellen 5B1-4 (High five), ein klonales Isolat aus einer embryonalen *Trichopulsia ni* Zelllinie (Invitrogen, Karlsruhe).

3.8 Humanes Cytomegalievirus

Für Infektionen wurde der Laborstamm AD169 verwendet, der ursprünglich von W. P. Rowe isoliert wurde (Rowe et al., 1956).

3.9 Benzimidazol-D-Ribonukleoside

Die folgenden Substanzen aus der Klasse der Benzimidazol-D-Ribonukleoside wurden im Labor von Leroy B. Townsend, University of Michigan, synthetisiert. Stocklösungen von 5 mg/ml in DMSO wurden bei -80°C gelagert.

BDCRB: 2-Bromo-5,6-dichloro-(1- β -D-ribofuranosyl) Benzimidazol

Cl₄RB: 2,4,5,6-Tetrachloro-1-(2,3,5-tri-O-acetyl- β -D-ribofuranosyl) Benzimidazol

CDMRB: 2-Chloro-5,6-dimethyl-(1- β -D-ribofuranosyl) Benzimidazol

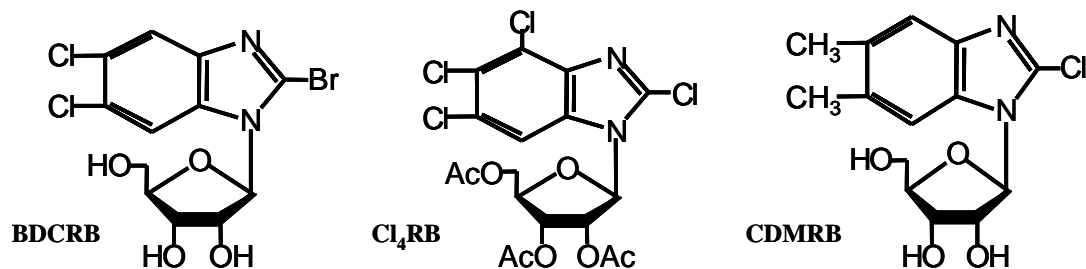


Abb. 3.1 Schematische Darstellung der verwendeten Benzimidazol-D-Ribonukleoside

3.10 Bakterien

***E. coli* K12 XL1-Blue:** supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F⁻ [proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15 Tn10(tet^r)] (Bullock et al., 1987)

***E. coli* BL21:** B F⁻, ompT, hsdS (rB⁻, mB⁻), gal, dcm (Studier and Moffatt, 1986)

***E. coli* DH10B:** F-endA1 hsdR17 (rk⁻, mk⁺) supE44 thi-1-recA1 gyrA96 relA1 deoR (lacZYA-argF)-U169f80lac M15 (Grant et al., 1990).

3.11 Plasmide

3.11.1 pcDNA3.1/HisA,B,C

Der Vektor pcDNA3.1HisA,B,C wurde von der Firma Invitrogen, Karlsruhe bezogen. Er besitzt den HCMV-major immediate early-Promotor/Enhancer (P_{CMV})

und den T7-Promotor (T7). Für die Insertion von Fremd-DNA steht eine *multiple cloning site* (MCS) mit singulären Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen zur Verfügung. Bei Expression in eukaryontischen Zellen werden Fusionsproteine exprimiert, die an ihrem Aminoterminal (N-Terminus) das Anti-XpressTM Epitop gefolgt von sechs Histidinen [(His)₆] und einer Enterokinase-Erkennungssequenz tragen. Das Anti-XpressTM Epitop wird spezifisch durch den Anti-XpressTM Antikörper erkannt. Weiterhin ist eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion in Bakterien vorhanden.

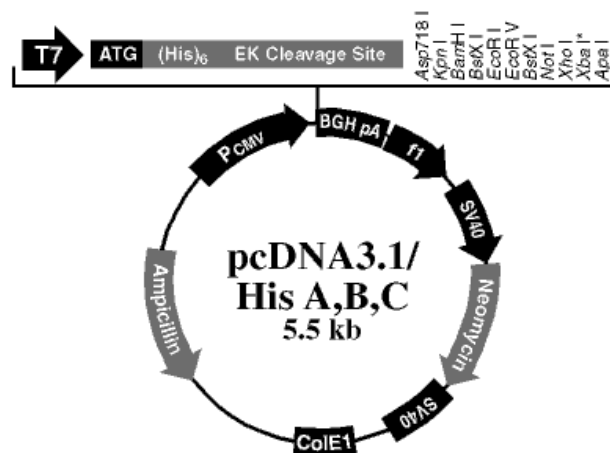


Abb 3.2 Schematische Darstellung des Vektors pcDNA3.1/HisA,B,C. Der Expressionsvektor enthält eine MCS mit vorangehendem XpressTM- und His-Epitop, sowie den P_{CMV}- und den T7-Promotor. Für die Replikation und Selektion in Bakterien besitzt der Vektor den ColE1 ori und ein Ampicillin-Resistenz-Gen.

3.11.2 pGEX-6P-1

Der bakterielle Expressionsvektor pGEX-6P-1 wurde von der Firma Amersham Bioscience (Freiburg) bezogen. Der Vektor ermöglicht die bakterielle Expression eines Fusionsproteins bestehend aus der Glutathion-S-Transferase (GST, 26 kDa, N-terminal, Smith and Johnson, 1988) und dem inserierten Protein. Die Transkription wird durch den tac-Promotor (Ptac) kontrolliert, der durch Zugabe von Isopropyl-βD-Thiogalaktosid (IPTG) induziert werden kann und dann für eine hohe Expressionsrate des rekombinanten Proteins in *E.coli* BL21 sorgt. Zwischen dem GST-Anteil und der MCS ist eine PreScission ProteaseTM-Schnittstelle kodiert, die die Entfernung des GST-Tags ermöglicht. Mit Hilfe des β-Lactamase-Gens (Ampicillin-Resistenz, AmpR) lassen sich transformierte Bakterien selektionieren.

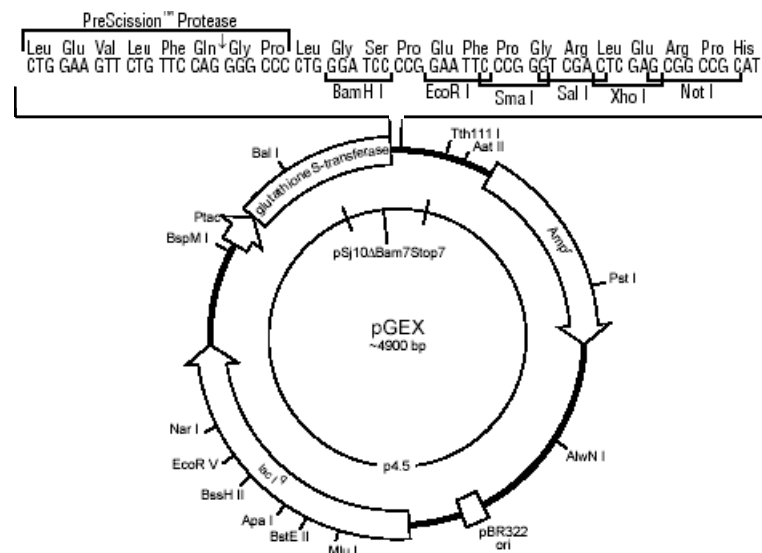


Abb. 3.3 Schematische Darstellung des Vektors pGEX-6p-1. Der Expressionsvektor enthält eine MCS mit vorangehenden Sequenzen für einen GST-Tag sowie eine PreScission Protease™-Schnittstelle. Die Expression wird über den tac-Promotor kontrolliert. Für Selektion in Bakterien besitzt der Vektor Ampicillin-Resistenz-Gen sowie ein *lacI^q*-Gen.

3.11.3 pFastBAC™ HT A

Der Vektor pFastBAC™ HT A ist Teil des Bac-to-Bac® Baculovirus Expression Systems (Invitrogen, Karlsruhe) zur Herstellung rekombinanter Baculoviren. Er verfügt über einen Polyhedrin-Promoter (P_{PH}) zur effektiven Expression des Zielgens in Insektenzellen, sowie über einen 6xHis tag und eine TEV-Protease Schnittstelle vor der MCS. Zur spezifischen Transposition des Zielgens in das Baculovirusgenom (z.B. bmon14272 bacmid) werden Tn7 L+R Elemente verwendet. Weiterhin sind eine Ampicillin- sowie eine Gentamycin-Resistenz zur Selektion des Plasmids in *E. coli* bzw. des rekombinanten Bacmids in DH10Bac™ *E. coli*.

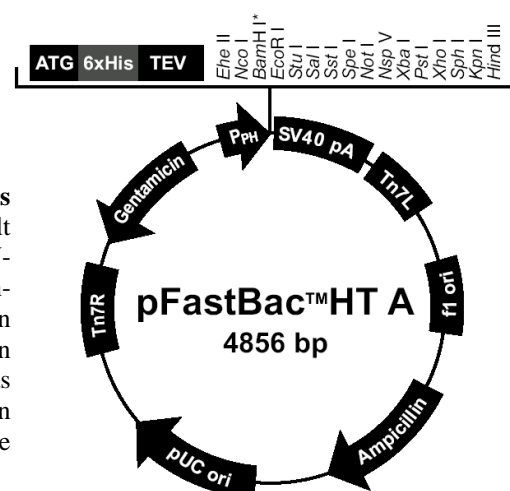


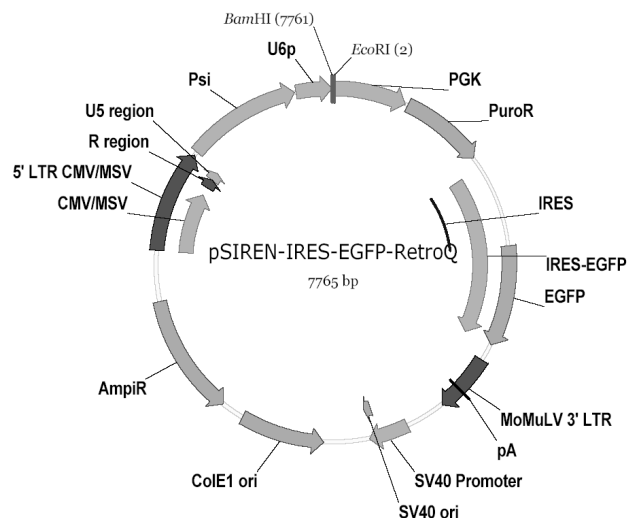
Abb 3.4 Schematische Darstellung des Vektors pFastBAC™ HT A. Der Expressionsvektor enthält eine MCS mit vorangehendem His-Epitop und TEV-Protease Schnittstelle, sowie den Polyhedrin-Promotor. Für die Replikation und Selektion in Bakterien besitzt der Vektor den pUC ori und ein Ampicillin-Resistenz-Gen. Zur Transposition in das Baculogenom und anschließende Selektion in DH10Bac™ *E. coli* werden Tn7L+R Elemente sowie eine Gentamycin-Resistenz verwendet.

3.11.4 pSIREN-IRES-EGFP-RetroQ

pSIREN-IRES-EGFP-RetroQ ist ein selbst inaktivierender retroviraler siRNA-Expressionsvektor, der von RNAi-Ready pSIREN RetroQ (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) abgeleitet ist. Er enthält die Schnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI für die Klonierung von dsOligonukleotiden, die für *short hairpin*-RNA (shRNA) kodieren. Expression der shRNA steht unter Kontrolle des Polymerase III-abhängigen humanen U6-Promotors (U6p). Der Vektor kann als Expressionsplasmid und für die Expression eines viralen genomischen Transkripts nach Transduktion über retrovirale Partikel verwendet werden. Die Selektion stabil transduzierter eukaryotischer Zellen erfolgt über eine Puromycin-Resistenz. Der Vektor enthält zusätzlich die kodierende Sequenz für das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), deren Expression über eine *internal ribosomal entry site* (IRES) vermittelt wird, so dass die eGFP Expression bicistronisch an die Puromycin Expression gekoppelt ist. Der Vektor wurde freundlicherweise von Frau Effi Wies (AG Neipel, Institut für Klinische und Molekulare Virologie, Erlangen) zur Verfügung gestellt.

Abb 3.5 Schematische Darstellung des Vektors pSIREN-IRES-EGFP-RetroQ.

Der Vektor enthält zwei singuläre Schnittstellen zur Einklonierung von Oligonukleotiden, deren Expression unter Kontrolle des U6-Promotors steht. Die Selektion von eukaryotischen Zellen erfolgt über eine Puromycin-Resistenz, an die eine eGFP-Expression gekoppelt ist. Für die Replikation und Selektion in Bakterien besitzt der Vektor den ColE1 ori und ein Ampicillin-Resistenz-Gen.



3.11.5 pSIREN-IRES-EGFP-RetroQ siLuci

In dieses Konstrukt wurde ein gegen das Luciferase-Gen gerichtetes shRNA-Oligonukleotid (shLuci-5' und shLuci-3'; s 3.12) kloniert. Es wurde von Sabine Rechter, Institut für Virologie, Universität Erlangen-Nürnberg, zur Verfügung gestellt.

3.11.6 pVSVG

Eukaryotisches Expressionsplasmid, welches für das Hüllprotein G (VSVG) des Vesikulären-Stomatitis-Virus (VSV) kodiert. Die Expression des Glykoproteins VSVG ermöglicht die Herstellung von Retroviren mit einem breiten Wirtsspektrum und erhöhter Stabilität (Burns *et al.*, 1993).

3.11.7 pHIT60

Eukaryotisches Expressionsplasmid, das für die Gag- und Pol-Proteine des murinen Leukämievirus unter Kontrolle des CMV-Promotors kodiert. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. K. Überla, Bochum, zur Verfügung gestellt.

3.11.8 pGEX-UL56C

Das Konstrukt pGEX-UL56C kodiert für die carboxyterminale Hälfte von HCMV pUL56 als GST-Fusionsprotein im Vektor pGEX-5X-1 (Giesen *et al.*, 2000).

3.11.9 pGEX-UL56N

Das Konstrukt pGEX-UL56N kodiert für die aminoternale Hälfte von HCMV pUL56 als GST-Fusionsprotein im Vektor pGEX-5X-1. Das Konstrukt wurde freundlicherweise von PD Dr. Elke Bogner, Institut für Virologie, Universität Erlangen-Nürnberg, zur Verfügung gestellt.

3.11.10 pGEX-UL89

Das Konstrukt pGEX-UL89 kodiert für HCMV pUL89 als GST-Fusionsprotein im Vektor pGEX-5X-1 (Hwang and Bogner, 2002).

3.11.11 pcDNA-MCP

Das Konstrukt pcDNA-MCP kodiert für HCMV pUL86, das *major capsid protein* MCP in pcDNA3. Das Konstrukt wurde freundlicherweise von PD Dr. Elke Bogner, Institut für Virologie, Universität Erlangen-Nürnberg, zur Verfügung gestellt.

3.11.12 Cosmid pCM1028

Das Cosmid pCM1028 codiert einen Teil des HCMV AD169 Genoms, der auch den UL104 ORF umfasst (Fleckenstein *et al.*, 1982).

3.12 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma biomers.net GmbH, Ulm, bezogen. Sofern nicht anders angegeben, sind die Primer in 5'-3'-Orientierung dargestellt. Kursive Sequenzabschnitte zeigen Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen an. Unterstrichene Sequenzabschnitte zeigen bei sh-RNA Oligonucleotiden die Ziel-sense bzw. -antisense-Sequenzen an.

3.12.1 Klonierungsprimer

UL104-hin/*EcoRI*

GCGAATTCATGGAGCGAAACCACTGGAACGAA

UL104-rück/*NotI*

GCGCGGCCGCTAGTGAAATCCGTATGGACCTCCAGC

UL104Ct-hin/*EcoRI*

GCGAATTCAAGTTTTTGCTTAACGTCTCGG

UL104Nt-rück/*NotI*

GCGCGGCCGCCATAATGGACTTTTTGGCGTC

UL104Mi-hin/*EcoRI*

GCGAATTCGAGCGGGCGCAATTTGTACGC

UL104Mi-rück/*NotI*

GCGCGGCCGCGCCGGGCACGAACTGCGAGAA

3.12.2 Sequenzierprimer

T7hin

TAATACGACTCACTATAGGG

pcDNA-rück

AGGGGCAAACAACAGATG

pGEX-6P-1hin

GGCGACCATCCTCCAAAATCGG

pGEX-6P-1rück

CAGAGGTTTTACCGTCATCACCG

3.12.3 shRNA-Oligonukleotide

shLuci-5'

GATCCGTGCGTTGCTAGTACCAACTTCAAGAGAGTTGGTACTAGCAACGC
ACTTTTTTGTAGCG

shLuci-3'

GCCACGCAACGATCATGGTTGAAGTTCTCTCAACCATGATCGTTGCGTGA
AAAAACGATCGCTTAA

104sh1-5'

GATCCGCGACGACTATGGTCTCTACTTCAAGAGAGTAGAGACCATAGTCG
TCGCTTTTTTCTCGAGG

104sh1-3'

GCGCTGCTGATACCAGAGATGAAGTTCTCTCATCTCTGGTATCAGCAGCG
AAAAAAGAGCTCCTTAA

104sh2-5'

GATCCGCGTCTCGGACAGCAAATCGTTCAAGAGACGATTTGCTGTCCGAG
ACGCTTTTTTCTCGAGG

104sh2-3'

GCCGGAGCCTGTCGTTTAGCAAGTTCTCTGCTAAACGACAGGCTCTGCGA
AAAAAAGAGCTCCTTAA

3.13 Geräte

Bedampfungsanlage Turbo Carbon Coater 208	Cressington Scientific Instruments Ltd., Watford UK
Bio-Imager BAS 1000	Fujifilm, Düsseldorf
CCD-Kamera LAS-100	Fujifilm, Düsseldorf
Elektronenmikroskop EM T109	Zeiss, Oberkochen
Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 135	Zeiss, Oberkochen
Geltrockner Model 583	Biorad, München
Laser-Scanning-Mikroskop LSM 410	Zeiss, Oberkochen
Thermozykler Cyclone 25	Peqlab, Erlangen
Ultramikrotom Ultracut S	Leica Microsystems, Wetzlar

Ultraschallgerät Branson Sonifier 450	Branson, Dambury
Ultrazentrifuge L7-55	Beckmann, Frankfurt
Scanner Microtek ScanMaker E6	Mikrotek, Willich
Spot Digital Kamera	Zeiss, Oberkochen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus Sepatech, Osterode
Zentrifuge Rotina 48R	Hettich, Tuttlingen

4. Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung von HFF- und 293T-Zellen

Die adhärent wachsenden HFF- und 293T-Zellen werden je nach benötigter Menge in 25 cm², 75 cm² oder 175 cm² Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) herangezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgt in DMEM-Kulturmedium bei einer konstanten Temperatur von 37 °C im offenen System bei 5%iger CO₂-Begasung. Für das Passagieren werden die konfluent gewachsenen Monolayer nach Absaugen des Kulturmediums einmal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 3 ml Trypsin/EDTA (T/E) zu 25 cm² Flaschen, 5 ml T/E zu 75 cm² Flaschen bzw. 9 ml T/E zu 175 cm² Zellkulturflaschen abgelöst. Anschließend werden die Zellen im Verhältnis 1:3 (HFF) bzw. 1:5 (293T) in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit DMEM inkubiert.

Zum Ansetzen von Deckglaskulturen für Immunfluoreszenzen werden vor der Aussaat der Zellen in eine 6-well-Kulturschale Deckgläschen in die Vertiefungen eingebracht und mit jeweils 2 ml DMEM beschichtet.

Zur Lagerung von Zellen wird der Inhalt einer 175 cm² Zellkulturflasche nach dem Ablösen mit T/E sedimentiert (1.000 x g, 5 min, 4 °C), in 3 ml FCS mit 10% (v/v) DMSO resuspendiert und in 1 ml Aliquots bei –80°C gelagert. Das Abkühlen erfolgt dabei über Nacht (üN) in Isopropanol, um ein langsames Absinken der Temperatur zu erreichen.

4.1.2 Kultivierung von Insektenzellen

Insektenzellen 5B1-4 (High5) werden in 175 cm² Zellkulturflaschen unter Verwendung von TC-100 Medium bei 27°C kultiviert. Zum Passagieren werden die Zellen mechanisch abgelöst und im Verhältnis 1:2 geteilt.

Zur Lagerung der Zellen werden diese nach dem Ablösen sedimentiert (1.000 x g, 5 min, 4 °C), in 4 ml TC-100 mit 7,5% (v/v) DMSO resuspendiert und in 1 ml Aliquots bei –80°C gelagert. Das Abkühlen erfolgt dabei üN in Isopropanol, um ein langsames Absinken der Temperatur zu erreichen.

4.1.3 Herstellung von Virusstocks und Virustitration

Für die Anzucht von HCMV AD169 und die Herstellung von Virusstocks werden konfluente HFF in 175 cm²-Flaschen mit einer niedrigen *multiplicity of infection* (MOI) von 0,1 infiziert. Nachdem ca. 50% der Zellen einen cytopathischen Effekt aufweisen, wird das Medium erneuert. In der Regel kann der Kulturüberstand nach 10 Tagen abgenommen werden. Durch Sedimentation (1.000 x g, 5 min, 4 °C) werden noch vorhandene Zellbestandteile im Medium entfernt. Die zellfreie Virussuspension wird anschließend über einen 0,45 µm Sterilfilter filtriert, aliquotiert und bei –80°C gelagert.

Zur Bestimmung infektiöser Einheiten nach der Endpunktverdünnungsmethode wird eine logarithmische Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-6} , Doppelbestimmung) in Kulturmedium angesetzt. Mit diesen Verdünnungen werden konfluente HFFs infiziert (s. 4.1.4) und 24 h bei 37°C inkubiert. Durch indirekte Immunfluoreszenz (s. 4.3.1) unter Verwendung des mAb63-27 sowie eines Anti-Maus/Cy2 Sekundärantikörpers wird das im Zellkern lokalisierte HCMV-IE1 nachgewiesen und durch Auszählen der angefärbten Kerne pro Plättchen der Virustiter ermittelt. Die durchschnittliche Anzahl der infektiösen Einheiten (n)/ml Stammsuspension ermittelt sich aus der letzten Verdünnung (10^{-x}), in der noch wenige Kerne (y) in der Immunfluoreszenz positiv sind, nach der Formel: $n = y \text{ mal } 10^x$ pro ml getestete Virussuspension.

4.1.4 Experimentelle Virusinfektion

Zur Infektion von konfluenten HFF mit HCMV AD169 wird, soweit nicht anders angegeben, eine MOI von 1 verwendet. Hierzu werden die Zellen einmal mit DMEM ohne FCS gewaschen und dann die entsprechende Menge Virussuspension in DMEM ohne FCS auf die Zellen gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit findet die Virusadsorption und die Infektion der Zellen statt. Anschließend wird der Überstand durch DMEM mit 2% (v/v) FCS ersetzt. Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Für die experimentelle Virusinfektion unter Zugabe von Phosphonoessigsäure (PAA; Sigma-Aldrich, Steinheim), einem spezifischen Inhibitor der viralen DNA-Polymerase, wird eine steril filtrierte Stammlösung (1 mg/ml, pH 7,4) vorbereitet. Die Behandlung der Zellen erfolgt mit einer PAA-Endkonzentration von 200 µg/ml. Die PAA-Stammlösung wird bei allen Arbeitsschritten der Virussuspension bzw.

dem Kulturmedium zugesetzt.

4.1.5 Transfektion von 293T-Zellen mittels Lipofectamine™ 2000

Zum Einbringen von Plasmid-DNA in 293T-Zellen erfolgt die Transfektion mittels Lipofectamine™ 2000 nach den Angaben des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe). Hierbei handelt es sich um ein kationisches Lipid, das unter Bildung von Liposomen mit der negativ geladenen DNA interagiert. Diese Komplexe fusionieren mit der Plasma-Membran der zu transfizierenden Zellen, wodurch die Fremd-DNA in die Zellen eingebracht wird.

293T-Zellen werden zunächst in 6-wells bis zum Erreichen von ca. 90 % Konfluenz angezüchtet und mit 2 ml DMEM ohne Zusätze überschichtet. Zur Transfektion werden pro well je 4 µg DNA bzw. 10 µl Lipofectamine™ 2000 zu 250 µl DMEM gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. DNA und Transfektionsreagenz werden gründlich gemischt und weitere 20 min bei RT inkubiert. Danach wird der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben und üN bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird der Überstand durch normales DMEM-Kulturmedium ersetzt und für weitere 24 h unter den oben genannten Bedingungen inkubiert. Bei größeren Ansätzen werden die verwendeten Mengen entsprechend der Fläche erhöht.

4.1.6 Gewinnung von Zellextrakten

Zur Gewinnung von Zellextrakten werden Monolayer-Kulturen zunächst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach dem Abschaben vom Flaschenboden werden die Zellen sedimentiert (1.000 x g, 5 min, 4 °C), je nach Verwendungszweck in 500 µl IP- (s. 4.3.4) oder Co-IP-Puffer (s. 4.3.5) aufgenommen und mit Hilfe eines Ultraschallgerätes für 30 s bei voller Leistung und 4°C homogenisiert. Durch eine anschließende Sedimentation bei 10.000 x g für 30 min bei 4 °C werden nicht gelöste Zelltrümmer entfernt. Der Überstand wird aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für direkte Immunoblot-Analysen ohne vorherige Präzipitation werden infizierte Zellen in 75 cm² Flaschen ebenfalls in 500 µl Co-IP-Puffer aufgenommen, transfizierte Zellen aus 6 wells in 150 µl, und jeweils 15 µl Zelllysate verwendet. Um eine Proteindegradation zu verhindern, wird allen Puffern kurz vor Gebrauch der Proteaseinhibitor PMSF (0,2 mM) zugesetzt. Der IP- und Co-IP-Puffer erhalten zusätzlich den Protease-Inhibitor Mix M (AEBSF, Aprotinin, Bestatin, E-64,

Leupeptin und Pepstatin A; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) in einer 1:100 Verdünnung.

4.1.7 Zellfraktionierung

Die Zellfraktionierung erlaubt die differenzierte Untersuchung von Zelllysaten auf den Proteingehalt von Kern- und Zytoplasma-Bereichen. Die unterschiedlichen Fraktionen können im Anschluß in der Immupräzipitation untersucht werden.

Zur Fraktionierung werden nicht-infizierte oder AD169-infizierte HFF (s. 4.1.4) in 175 cm²-Flaschen zunächst in PBS geerntet. Die Zellsedimente werden anschließend in 5 ml hypotonem Puffer H gewaschen (1.000 x g, 5 min), in 1 ml Puffer H resuspendiert und zum Aufquellen der Zellen 5 min auf Eis inkubiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgt durch Zugabe von 1 ml Puffer H mit 1% (v/v) Triton X-100 und 5-minütiger Inkubation auf Eis mit gelegentlicher mechanischer Resuspension. Es wird je ein Aliquot von 200 µl abgenommen und als Homogenat-Fraktion aufbewahrt. Anschließend werden die freigesetzten Kerne sedimentiert (1.000 x g, 5 min) und der Überstand als Zytoplasma-Fraktion aufbewahrt. Das Kernsediment wird in 1,5 ml Puffer H plus 0,5 % (v/v) Triton X-100 resuspendiert und mit 1,62 M Sucrose in Puffer H versetzt (Endkonzentration = 0,3 M), um ein Aneinanderhaften der Kerne zu verhindern. Für die Aufreinigung der Kerne wird die Suspension auf ein 3 ml-Sucrosekissen aus 1,62 M Sucrose in Puffer H geschichtet und bei 2.100 x g für 15 min zentrifugiert. Das Kernsediment wird in 1,5 ml Puffer H plus 0,5 % (v/v) Triton X-100 und 0,3 M Sucrose resuspendiert. Durch Zentrifugation bei 1.000 x g für 5 min werden die Kerne erneut sedimentiert und noch vorhandene Triton X-100 empfindliche Membranen (äußere Kernmembran, zytoplasmatische Membranen) entfernt. Schließlich werden die gereinigten Kerne in 500 µl IP-Puffer aufgenommen. Die Homogenat- und Zytoplasma-Fraktion wird an die Salz- und Detergenzbedingungen des IP-Puffers angepaßt. Alle Fraktionen werden durch Ultraschall homogenisiert und nicht gelöste Zelltrümmer sedimentiert (100.000 x g, 30 min). Alle Arbeitsschritte werden bei 4°C durchgeführt. Den eingesetzten Lösungen werden kurz vor Gebrauch der Proteaseinhibitor PMSF (0,2 mM) sowie der Protease-Inhibitor Mix M (AEBSF, Aprotinin, Bestatin, E-64, Leupeptin und Pepstatin A; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) in einer 1:100 Verdünnung zugesetzt.

Puffer H pH 7,5

KaCl	5 mM
MgCl ₂	1 mM
Tris/HCl	25 mM
<i>aqua dest</i>	

4.1.8 Aufreinigung extrazellulärer Virionen

Zur Isolierung von extrazellulären Virionen wird der Überstand von AD169 infizierten HFF (s. 4.1.4) in 175 cm²-Flaschen 96 h p.i. abgenommen. Zellfragmente werden 10 min bei 3.500 rpm sedimentiert und der Überstand 70 min bei 100.000 x g und 4°C (SW28-Rotor; Beckmann, Frankfurt) zentrifugiert. Das Virussediment wird in 200 µl PBS resuspendiert. Für Immunoblot-Analysen werden jeweils 15 µl verwendet.

4.1.9 Herstellung rekombinanter Baculoviren

Zur Expression von Proteinen über rekombinante Baculoviren wird das Bacmid bMON14272, in welches das Zielgen eingebracht wurde, in High5 Zellen in 25 cm² Flaschen transfiziert. Die Zellen werden mit TC-100 ohne FCS gewaschen und mit 1 ml TC-100 ohne FCS überschichtet. Für einen Transfektions-Ansatz werden 5 µl DNA aus einer Minipräparation (s. 4.2.1.1) mit 45 µl *aqua dest* und 50 µl Cellfectin[®] Reagent (Invitrogen, Karlsruhe) gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl TC-100 ohne FCS wird die Lösung auf die Zellen gegeben und für 5 h bei 27°C inkubiert. Danach wird die Transfektions-Lösung entfernt und 5 ml frisches TC-100 zugegeben. Der virushaltige Überstand wird 48 h nach Transfektion geerntet, über einen 0,45 µm Sterilfilter filtriert und bei 4°C gelagert.

4.1.10 Herstellung rekombinanter Retroviren

Zur Transduktion von Zellen mittels Retroviren werden 5x10⁶ 293T Zellen in 10 cm Schalen ausgesät. Am nächsten Tag werden mittels Lipofectamine[™] 2000 (s. 4.1.5) je 4,5 µg der Verpackungsplasmide pHIT60 und pVSV-G sowie 3 µg eines verpackungskompetenten Expressionsplasmids transfiziert. Gebildete Retroviren werden in den Überstand abgegeben und 48 h nach Transfektion abgenommen. Nach Filtration über einen 0,45 µm Sterilfilter werden je 2 ml mit 3 µl Polybrene (5 mg/ml) gemischt und HFF in 6-wells (80.000 Zellen/well) damit infiziert. Der Rest wird aliquotiert und bei -80°C gelagert.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Plasmidpräparation aus Bakterien

4.2.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Plasmidpräparation im kleinem Maßstab von bis zu 20 µg werden Bakterien einer alkalischen Lyse unter Verwendung von Puffern der Firma Qiagen, Hilden, unterzogen und die Plasmid-DNA über eine Isopropanol-Fällung isoliert.

Einzeln gewachsene Bakterienkolonien (s. 4.2.9) werden in 5 ml LB-Amp üN auf einem Schüttler bei 37 °C angezogen. 1,5 ml der Bakteriensuspension werden sedimentiert (3.000 rpm, 10 min), in 250 µl P1 resuspendiert und mit 250 µl P2 lysiert. Nach Zugabe von 350 µl P3 werden die präzipitierten Bestandteile abzentrifugiert (13.000 rpm, 10 min). Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Cup überführt und die DNA nach Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt (13.000 rpm, 20 min). Nach Waschen mit 70% Ethanol wird das Sediment luftgetrocknet und in 40 µl *aqua dest* aufgenommen. Die Plasmid-DNA wird bei –20°C gelagert.

Qiagen-Puffer P1-3

Die Zusammensetzung der Puffer ist den Herstellerangaben zu entnehmen.

4.2.1.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Auf der Basis eines positiven Bakterienklons wird unter Verwendung des QIAGEN® Plasmid Maxi Kit eine Plasmidpräparation großen Maßstabs (bis zu 100 µg Plasmid-DNA) nach Herstellerangaben angefertigt. Das Verfahren basiert auf der alkalischen Lyse der Zellen und anschließender Aufreinigung der Plasmid-DNA über einen Anionenaustauscher. Im letzten Schritt wird die eluierte DNA über eine Isopropanol-Fällung isoliert.

200 ml einer Übernachtskultur in LB-Amp werden sedimentiert, lysiert und die Zelltrümmer entfernt. Die DNA bindet nach dem Beladen der QIAGEN-tips an die Säulenmatrix und wird nach mehrmaligem Waschen eluiert und mit Isopropanol gefällt. Die gereinigte Plasmid-DNA wird in 100-200 µl *aqua dest* aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Qiagen-Puffer

Die Zusammensetzung der Puffer ist den Herstellerangaben zu entnehmen.

4.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in Lösung

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA-Präparationen werden diese 1:100 in *aqua dest* verdünnt, um den linearen Meßbereich von $E = 0,1-0,8$ einzuhalten. Die Extinktion wird gegen einen Leerwert bei einer OD von 260 nm gemessen und zur Konzentrationsmessung verwendet. Für die Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA (dsDNA) gilt folgende Richtlinie: $OD_{260nm} = 1,0$ entspricht 50 µg/ml dsDNA bei 1 cm Lichtweg. Daher gilt:

$$\text{Konzentration (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = OD_{260} \times 1/\text{Verdünnung} \times 50/1000.$$

4.2.3 Restriktion doppelsträngiger DNA mittels Endonukleasen

Für das Klonieren von Zielgenen in Plasmidvektoren und die anschließende Kontrolle des Vorgangs oder die Linearisierung zirkulärer DNA-Stücke wird dsDNA durch Endonukleasen an spezifischen Sequenzabschnitten gespalten. Je nach Zielsetzung werden für Kontrollreaktionen bzw. Klonierungen 1 µg bzw. 5 µg Plasmid-DNA oder PCR-Amplifikat eingesetzt. Ein Reaktionsansatz enthält weiterhin 0,1 Volumenteil (VT) der verwendeten Endonuklease (bei Restriktion mit zwei Enzymen je 0,05 VT), 0,1 VT des für die Nuklease geeigneten 10x Reaktionspuffers und falls benötigt 0,1 VT 10x BSA. Je nach Menge der eingesetzten DNA beträgt das Gesamtvolumen, das mit *aqua dest* eingestellt wird, 10 µl bzw. 50 µl. Der Reaktionsansatz wird für 2 h bei 37°C inkubiert.

4.2.4 Dephosphorylierung linearisierter Plasmide

Durch dieses Verfahren werden die 5'-Phosphatgruppen an den Enden linearisierter Plasmide dephosphoryliert, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Religation von Plasmiden verringert wird. Die Dephosphorylierung findet im Anschluss an eine Restriktion (s. 4.2.3) statt, so dass zu dem vorhandenen Reaktionsansatz 2 µl des Enzyms alkalische Phosphatase zugegeben werden. Der Ansatz wird für 30 min bei 37°C inkubiert.

4.2.5 Aufreinigung von DNA aus Enzym-haltigen Ansätzen

Restriktions-, Dephosphorylierungs- und PCR-Ansätze enthalten neben der DNA noch Enzyme und andere Bestandteile, die für das weitere Vorgehen unerwünscht sind. Dies gilt ebenfalls für die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen (s. 4.2.8). Diese Bestandteile werden mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kits (Macherey-

Nagel, Düren) entsprechend der Angaben des Hersteller-Protokolls entfernt. Die DNA adsorbiert an eine Säulenmatrix, wird durch Waschen von Verunreinigungen befreit und schließlich in 30–50 µl *aqua dest* oder Elutionspuffer eluiert. Die Lagerung des Eluats erfolgt bei –20°C.

Kit-Puffer

Die Zusammensetzung der Puffer ist den Herstellerangaben zu entnehmen.

4.2.6 Fällung von DNA

Zum Ankonzentrieren oder einer schnellen Aufreinigung von vorhandenen DNA-Präparationen wird die DNA gefällt. Zum Reaktionsansatz wird zunächst 0,1 VT 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 VT 100% Ethanol zugegeben. Nach Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm wird das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wird anschließend getrocknet und in 10-20 µl *aqua dest* aufgenommen.

4.2.7 Ligationsreaktion

Die Ligation wird verwendet, um ein DNA-Fragment in einen linearisierten Vektor einzubringen. Dazu werden an den DNA-Enden zunächst komplementäre Überhänge durch Restriktion (s. 4.2.3) erzeugt. Weiterhin wird der Vektor dephosphoryliert, um eine Religation zu vermeiden (s. 4.2.4). Die verwendete Ligase verbindet die 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Enden der DNA-Fragmente unter ATP-Verbrauch.

In einem Gesamtvolumen von 15 µl werden 10-50 ng Vektor, 3 µl des 5x Ligasepuffers, 1 mM ATP und 1 µl der T4-DNA-Ligase (1 U/µl) eingesetzt. Das DNA-Insert wird 5:1 im Überschuß zugegeben. Die Reaktion findet in bei 14°C statt.

4.2.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA in einem Agarosegel dient der Größenbestimmung bzw. der Mengenabschätzung der eingesetzten DNA im Vergleich zu einem DNA-Längenstandard definierter Menge. Weiterhin lassen sich DNA-Fragmente definierter Größe aufreinigen.

Hierzu werden die DNA-Proben und der DNA-Marker (1kb DNA Ladder; NEB, Frankfurt) mit 6-fach Probenpuffer in einfacher Endkonzentration versetzt und in die Taschen eines 1%igen TBE-Agarosegel gegeben. Die Auftrennung erfolgt unter

Verwendung eines 1x TBE-Laufpuffers und einer Spannung von 100 V. Das Agarosegel enthält weiterhin Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,15 µg/ml, das mit der dsDNA interkaliert. Infolge dessen können die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht von 254 nm nachgewiesen werden. Das Ergebnis wird photographisch festgehalten.

Bei einer Aufreinigung wird die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht von 366 nm ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert (s. 4.2.5).

4.2.9 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

Die Transformation ist ein Verfahren, bei dem Fremd-DNA in Bakterien transferiert wird. Hierzu werden kompetente Bakterienzellen verwendet, die entsprechend vorbehandelt wurden, um die Effizienz der Aufnahme von Fremd-DNA zu erhöhen. Die Transformation selbst erfolgt durch einen Hitzeschock.

4.2.9.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation mittels Hitzeschock werden je 20 µl der *E.coli*-Stämme XL-1-Blue oder BL21 in 5 ml LB-Tet oder LB-Medium üN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluß wird 1 ml der üN-Kultur zu 100 ml frischem LB-Tet oder LB-Medium gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C herangezogen. Danach werden die Bakterien für 15 min auf Eis inkubiert, bei 2.600 rpm für 15 min bei 4°C sedimentiert und in 33 ml RF1-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wird das Sediment in 8 ml RF2-Puffer aufgenommen, 15 min auf Eis inkubiert und in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei –80°C.

RF1-Puffer (pH 5,8) sterilfiltriert

RbCl	100 mM
MnCl ₂ x 2H ₂ O	50 mM
KAc	30 mM
CaCl ₂ x H ₂ O	10 mM
Glycerin	15% (v/v)
<i>aqua dest</i>	

RF2-Puffer (pH 6,8) sterilfiltriert

MOPS	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂ x H ₂ O	75 mM
Glycerin	15% (v/v)
<i>aqua dest</i>	

4.2.9.2 Hitzeschock -Transformation

Für die Transformation wird ein Aliquot kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut. Es wird 1 µl Plasmid-DNA bzw. 10 µl eines Ligationsansatz zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock folgt für 90 s bei 42°C, anschließend wird der Ansatz erneut 2-3 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 600 µl LB-Medium erfolgt eine Inkubation von 30 min bei 37°C zur Ausbildung der Antibiotika-Resistenz. Danach werden 100 µl des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit dem entsprechendem Antibiotikum verteilt. Der Rest wird 3 min bei 4.000 rpm sedimentiert, in einem Restvolumen von 100 µl resuspendiert und ebenfalls auf einer LB-Agarplatte verteilt. Die Platten werden üN bei 37°C inkubiert, wobei einzelne Bakterienklone entstehen.

4.2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wird eine PCR mit zwei spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt, welche antiparallel an die komplementären Stränge der Matrizen-DNA binden können (Mullis and Faloona, 1987). Durch Zugabe einer thermostabilen DNA-Polymerase und Desoxynukleotiden (dNTPs) wird die Verlängerung der als Primer dienenden Oligonukleotide ermöglicht. Die verwendeten Oligonukleotide tragen an ihrem 5'-Ende spezifische Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, die mit der DNA-Matrize nicht hybridisieren, jedoch für eine nachfolgende Insertion des Amplifikats in einen Vektor benötigt werden.

Die exponentielle Amplifikation der zu synthetisierenden DNA-Stränge erfolgt in einem Thermozykler unter folgenden Bedingungen: initiale Denaturierung für 5 min bei 95°C, 35 Zyklen aus Denaturierung (95°C, 30 s), Hybridisierung der Primer (52°C, 30 s) und Polymerisation (72°C, 1 min/kb), Vervollständigung der Stränge durch eine weitere Amplifikationsphase (72°C, 7 min). Nach Beendigung der Reaktion wird der Ansatz auf 15°C abgekühlt. Die Aufreinigung der Amplifikate

erfolgt über das Kit NucleoSpin® Extract II (s. 4.2.5). Die erfolgreiche Amplifikation der DNA wird durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel überprüft (s. 4.2.8).

Reaktionsansatz

Komponente	Menge
Matrizen-DNA	1 µg
10x PCR-Puffer (NEB)	5 µl
dNTP-Mix (je 2,5 mM)	5 µl
Primer hin (50 pmol/ µl)	2 µl
Primer rück (50 pmol/ µl)	2 µl
Vent-DNA-Polymerase (1 U/µl)	1 µl
<i>aqua dest</i>	ad 50 µl

4.2.11 Asymmetrische PCR für automatische Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung dient der Kontrolle von Klonierungen. Hierzu wird eine modifizierte Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) angewendet. Durch Verwendung von verschiedenfarbig fluoreszierenden 2',3'-Didesoxynukleotid-5'-Triphosphaten (ddNTPs) im dNTP-Mix kommt es zu Kettenabbrüchen der Synthesereaktion und somit zu einer Population unterschiedlich langer DNA-Fragmente, die sich nach ihrer Größe auftrennen lassen. Die Fluoreszenzfarbe ermöglicht eine Identifikation des jeweils endständigen Nukleotids. Zur Sequenzierung werden Ansätze von je 20 µl Volumen mit folgenden Komponenten angesetzt: 14,5 µl *aqua dest*, 0,5 µl DNA aus einer Minipräparation (s. 4.2.1.1), 25 pmol eines geeigneten Primers, 1 µl Big-Dye-Sequenzier-Kit und 3,5 µl Big-Dye-Polymerase-Puffer (ABI, Weiterstadt). Im Big-Dye-Sequenzier-Kit schon enthalten sind eine thermostabile DNA-Polymerase, nichtmarkierte dNTPs und fluoreszenzmarkierte ddNTPs. Die eigentliche PCR wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Denaturierung für 15 s bei 94°C, Anlagerung des Primers für 10 s bei 50°C, Polymerisierungsreaktion und Abbruchreaktion für 4 min bei 60°C. Für die Auftrennung und Auswertung wird der ABI Prism 3100 und das zugehörige Sequencing Analysis Programm (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet.

4.2.12 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung sehr großer DNA-Fragmente wie z.B. viraler DNA über das Anlegen von elektrischen Impulsen in einem Winkel von je 60° zur Laufrichtung.

Zur Isolierung intrazellulärer viraler DNA werden AD169-infizierte HFF in 6 cm Schalen (MOI=3; s. 4.1.4) mit PBS gewaschen, die Zellen abgelöst und nach Sedimentation (3.000 rpm, 10 min, 4°C) in 200 µl L-Puffer resuspendiert. Die Zellen werden mit gleicher Menge 2% SeaPlaque GTG Agarose (Bio-Rad Laboratories, München) sowie 10 mg/ml Proteinase K versetzt und in Blockform abgekühlt. Die Lyse der Zellen erfolgt durch Inkubation der Agarose-Blocks in 1,5 ml Lysepuffer bei 50°C üN. Die Proteinase K wird durch Waschen mit 10 VT TE-Puffer für 3x 30 min inaktiviert. Je ein Aliquot vorhandender Ansätze wird üN bei 37°C mit 50 U des Restriktionsenzym *NotI* behandelt. Nach Equilibrieren der Agaroseblocks in 0,5x TBE für 30 min werden die Blocks sowie ein Aliquot MidRange I pulsed-field Gelmarker (NEB, Frankfurt) in die Taschen eines 1% Agarosegels eingebracht. Der Lauf findet in 0,5x TBE für 20 h bei 14°C mit einem Pulswinkel von 120° und einer Pulszeit von 2-20 sec bei 6 V/cm statt. Das Gel wird im Anschluß für 30 min mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt, 10 min in Wasser entfärbt und fotografiert.

L-Puffer pH 7,5

Tris/Hcl	10 mM
NaCl	20 mM
EDTA	100 mM

Lysepuffer

L-Puffer + 1% Na-Sarkosyl, 100 µg/ml Proteinase K

TE-Puffer pH 8,0

Tris/HCl	10 mM
EDTA	10 mM

4.3 Immunologische Methoden

4.3.1 Affinitätsreinigung von Antikörpern mittels Affigel

Durch kovalente Ester-Bindung eines Protein-Antigens an eine Agarose-Matrix und anschließender Antigen-Antikörper Interaktion können spezifische Antikörper aus einem Antikörper-Pool wie z.B. humanen Serum isoliert werden.

Das Antigen wird üN gegen 2 l Kopplungspuffer (4°C) dialysiert. 9 ml Affigel 10 und 18 ml Affigel 15 (Bio-Rad Laboratories, München) werden mit *aqua dest* gewaschen und in einer Glasschale mit 10 ml Kopplungspuffer und dem Antigen üN bei 4°C auf einem Schwenktisch inkubiert. Der Ansatz wird in ein 50 ml-Röhrchen überführt, das Affigel-Material sedimentiert (2.100 x g, 15 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Nach Inkubation mit Blockpuffer für 1 h wird je einmal mit 50 ml *aqua dest* und Startpuffer gewaschen. Danach erfolgt die Zugabe von 5 ml Rekonvaleszentenserum und 15 ml Startpuffer für erneute Inkubation üN bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit je 50 ml Startpuffer werden gebundene Antikörper durch Zugabe von 5 ml Elutionspuffer durch eine Änderung des pH-Werts abgelöst. Der gewonnene Überstand wird mit 1,5 ml 2,5 M Tris/HCl pH 8,0 neutralisiert. Es werden 3 Antikörper-Fractionen erstellt. Das Affigel kann nach erneutem Waschen mit 2x *aqua dest* und 2x Startpuffer wiederverwendet werden und wird bei 4°C in Startpuffer gelagert. Den Antikörperfraktionen sowie dem Startpuffer für die Lagerung werden 0,02% (w/v) NaN₃ zugesetzt.

Kopplungspuffer pH 6,5

MES	0,1 M
-----	-------

Blockpuffer pH 8,0

Ethanol-Lamin/HCl	1 M
-------------------	-----

Startpuffer pH 8,0

NaCl	150 mM
Tris/HCl	50 mM

Elutionspuffer pH 2,8

Glycin/HCl	0,2 M
------------	-------

4.3.2 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz dient dem Nachweis von Antigenen wie rekombinanten Proteinen in transfizierten Zellen oder viralen Proteinen in infizierten Zellen mittels fluoreszenz-markierter Antikörper. Bei der indirekten Immunfluoreszenz erfolgt der Nachweis über einen markierten Zweitantikörper, der gegen den spezifischen, nicht-markierten Erstantikörper gerichtet ist. Die Immunfluoreszenz ist eine häufig genutzte Technik zur Identifizierung der subzellulären Lokalisation antigener Proteine.

4.3.2.1 *Fixierung und Permeabilisierung von Zellen*

Für die Immunfluoreszenz geeignet sind Fixierungsmethoden, bei denen weitgehend sowohl die morphologische Struktur der Zelle als auch die Antigenität erhalten bleiben. Die Paraformaldehyd-Fixierung erfordert zusätzlich die Permeabilisierung der Zellmembranen mittels nicht-ionischen Detergenzien, um die Bindung der Antikörper an intrazelluläre Antigene zu gewährleisten.

Die Zellen werden mit 3% Paraformaldehyd (w/v) in PBS für 20 min fixiert. Danach werden die Zellen mit PBS gewaschen, für 10 min mit 50 mM NH_4Cl in PBS abgesättigt, erneut gewaschen, für 5 min mit 0,2% Triton in PBS permeabilisiert und erneut gewaschen.

4.3.2.2 *Immunfluoreszenz von permeabilisierten Zellen*

Fixierte Deckglas-Kulturen werden mit dem Erstantikörper, welcher gegebenenfalls mit 3% BSA (w/v) in PBS verdünnt wird, für 60 min in einer feuchten Kammer inkubiert und im Anschluß nicht gebundener Antikörper durch Waschen mit PBS entfernt. Bei Co-Immunfluoreszenzen erfolgt die Inkubation mit einem weiteren Erstantikörper. Wurden beide Erstantikörper aus humanem Serum gewonnen, wird zur Vermeidung von Kreuzreaktion eine Absättigung mit unkonjugierten Anti-Human IgG (H+L) aus der Ziege zwischengeschaltet, so dass ein entsprechender anti-Ziege Zweitantikörper verwendet werden kann. Nach dem Waschen mit PBS folgt die Inkubation mit fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpern, ebenfalls in 3% BSA verdünnt, für 30 min ohne Lichteinwirkung. Bei Anfärbung der Zellkerne wird außerdem der DNA-Farbstoff TO-PRO[®]-3 (1:500; Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben. Die Präparate werden mit PBS und anschließend mit *aqua dest* gewaschen, um die Ausbildung von Salzkristallen zu verhindern. Die Deckgläschen werden mit

Fluoprep™ (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) mit 2,5% (w/v) DABCO auf Objektträgern fixiert, getrocknet und anschließend mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops (LSM) oder eines Epifluoreszenzmikroskops (Axioplan) und einer Kamera (Spot-Kamera) analysiert.

4.3.3 Immunoblot

Proteine aus Zelllysaten (s. 4.1.6) können nach Auftrennung über SDS-PAGE (s. 4.4.1/4.4.2) mittels Immunoblot nachgewiesen werden. Dabei werden nur die gesuchten Proteine spezifisch über Antikörper detektiert.

Zum Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (0,2 µm Porengröße; Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel) wird das Halbtrockenblot-Verfahren verwendet. Dazu werden zwischen zwei Graphit-Plattenelektroden (Keutz Labortechnik, Reiskirchen) drei in Blotpuffer getränkte Filterpapiere, die Nitrozellulosemembran, das Gel und wieder drei Filterpapiere passend aufeinander geschichtet. Durch den Transfer für 90 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² Blotfläche werden die Proteine auf die Membran übertragen. Die freien Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation für 30 min in 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS/0,1% Tween20 abgesättigt.

Nach 3x Waschen für 5 Minuten in PBS/0,1% Tween20 erfolgt die Inkubation für 2 h unter Schwenken mit dem spezifischen Erstantikörper, der in PBS/0,1% Tween20 verdünnt wird. Anschließend wird die Membran erneut gewaschen und für 90 min mit einem in PBS/0,1% Tween20 verdünnten Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgt der Nachweis der spezifisch detektierten Proteine über Zugabe von 10 ml ECL-Lösung A, 100 µl ECL-Lösung B und 3,1 µl Wasserstoffperoxid. Dies löst eine Lichtreaktion aus, die sich mittels CCD-Kamera (LAS-1000; Fujifilm, Düsseldorf) dokumentieren läßt. Bei der ECL-Reaktion (*enhanced chemoluminescence*) katalysiert die Peroxidase des Zweitantikörpers die Oxidation von Luminol und löst so Chemolumineszenz aus.

Durch Inkubation der Membran für 30 min in Harnstoff-Puffer können die Antikörper wieder abgelöst und die Membran nach erneutem Absättigen mit Milchpulver für weitere Proteindetektionen verwendet werden.

Blotpuffer

Glycin	200 mM
Tris	25 mM
Ethanol	20% (v/v)
<i>aqua dest</i>	

ECL-Lösung A

50 mg Luminol (Sigma-Aldrich, Steinheim) in 200 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,6

ECL-Lösung B

11 mg p-Hydroxycoumarinsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim) in 10 ml DMSO

Harnstoff-puffer

Tris/HCl pH 7,0	10 mM
NaCl	50 mM
EDTA	2 mM
Urea	8 M

4.3.4 Immunpräzipitation (IP)

Die Immunpräzipitation erlaubt die Isolation von Proteinen aus Zelllysaten über die Interaktion mit spezifischen Antikörpern, die über ihre F_C-Anteile an Protein-A-Sepharose (PAS) binden und daher sedimentiert werden können. In die Proteine wird über die Aminosäure Methionin radioaktiver Schwefel eingebaut, so dass sie im Anschluß an die IP über Autoradiographie detektiert werden können.

Nicht-infizierte oder AD169-infizierte HFF (s. 4.1.4) in 25 cm² Flaschen werden 72 h p.i. für 2 h mit Mangelmedium inkubiert (DMEM ohne Methionin/Cystein; Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein). Nach Zugabe von 50 µCi [³⁵S]-Methionin (Redivue™; Amersham Biosciences, Freiburg) für 1 h werden die Zellen geerntet (s. 4.4.6), in 500 µl IP-Puffer aufgenommen, 1:10 mit Antikörper versetzt und 2 h auf einem Überkopf-Taumler bei 4°C inkubiert. Danach werden 40 µl PAS (1:1 in IP-Puffer) zugegeben und üN inkubiert. Die PAS-Antikörper-Protein-Komplexe werden sedimentiert (1.500 x g, 5 min, 4°C) und 4x mit IP-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 15 µl 4xPP werden durch Erhitzen auf 95°C für 5 min die Proteine abgelöst und über SDS-PAGE (s. 4.4.1) aufgetrennt. Die Gele werden mit Coomassie-Lösung gefärbt (s. 4.4.3), getrocknet und zur autoradiographischen Detektion der Proteine eine BioImager-Platte oder ein Röntgenfilm (Biomax) aufgelegt. Bei Verwendung

einer BioImager-Platte erfolgt die Auswertung am Bio-Imager BAS 1000 (Fujifilm, Düsseldorf).

4.3.5 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Die Co-Immunpräzipitation dient dem Nachweis einer spezifischen Interaktion zweier in Lösung befindlicher Proteine mittels spezifischer Antikörper. Das erste Protein wird über seinen spezifischen Antikörper, der einen Komplex mit PAS eingeht, aus der Lösung isoliert. Der Interaktionspartner lässt sich daraufhin nach Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE im Immunoblot nachweisen.

Zelllysate aus 75 cm²-Flaschen nicht-infizierter oder AD169-infizierter HFF (s. 4.1.5) werden in 500 µl CoIP-Puffer resuspendiert. Pro Ansatz werden 50 µl Zelllysat mit dem verwendeten Antikörper und CoIP-Puffer auf 500 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wird für 2 h auf einem Überkopf-Taumler bei 4°C inkubiert. Danach werden 40 µl PAS (1:1 in CoIP-Puffer) zugegeben und erneut 2 h inkubiert. Die PAS-Antikörper-Protein-Komplexe werden sedimentiert (1.500 x g, 5 min, 4°C) und 4x mit CoIP-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 15 µl 4xPP werden durch Erhitzen auf 95°C für 5 min die Proteine abgelöst und über SDS-PAGE (s. 4.4.1) aufgetrennt. Die Analyse erfolgt über Immunoblot (s. 4.3.3) mit Antikörpern gegen den gesuchten Interaktionspartner. Weiterhin wird mit je einem 15 µl Aliquot der Zellxtrakte als Ladungskontrolle ein Immunoblot gegen Aktin durchgeführt.

4.4 Proteinchemische Methoden

4.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht erfolgt mittels SDS-PAGE nach Laemmli (1970).

Die Glasplatten für das Polyacrylamidgel werden mit den Abstandshaltern (1 mm) zusammengesetzt. Das 8%ige Trenngel wird nach Induktion der Polymerisationsreaktion durch 10% APS und TEMED bis auf 1 cm unter den Kamm gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach Polymerisation wird das Trenngel mit dem 3,75%igem Sammelgel überschichtet und der Kamm eingesetzt. Die Proben werden mit 4xPP versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und aufgetragen. Zur

Abschätzung der Molekulargewichte wird ein Größenstandard mitgeführt (PageRuler™ Protein Ladder bei anschließender Coomassie-Färbung, PageRuler™ PreStained Protein Ladder bei Immunoblot; Fermentas, St. Leon-Rot). Die Elektrophorese wird im Sammelgel bei 15 mA, nach dem Einlaufen der in das Trenngel bei 20 mA in 1x SDS-PAGE-Puffer durchgeführt.

Ist eine Auftrennung über eine herkömmliche SDS-PAGE nicht möglich, können Proteine über Zusatz von Harnstoff voneinander gelöst werden. Dazu werden die Proben in 2xSDS-Harnstoff-Puffer 2 h inkubiert und im Anschluß auf ein SDS-Gel mit zusätzlich 3,2 M Urea aufgetragen.

Sammelgel

Acrylamid	3,75% (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,1% (w/v)
Tris/HCL, pH 6,8	125 mM
SDS	0,1% (w/v)
Ammoniumpersulfat	0,04% (w/v)
TEMED	0,1% (v/v)
<i>aqua dest</i>	

Trenngel

Acrylamid	8% (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,21% (w/v)
Tris/HCL, pH 8,8	370 mM
Glycerin	5% (v/v)
SDS	0,1% (w/v)
Ammoniumpersulfat	0,1% (w/v)
TEMED	0,1% (v/v)
<i>aqua dest</i>	

10x SDS-PAGE-Puffer

Glycin	2 M
Tris	250 mM
SDS	1% (w/v)
<i>aqua dest</i>	

2xSDS-Harnstoff-Puffer pH 6,8

Tris/HCl	15 mM
β-Mercaptoethanol	2% (v/v)
Bromphenol-Blau	0.01% (w/v)
Glycerol	10% (w/v)
SDS	4% (w/v)
Urea	4% (w/v)
<i>aqua dest</i>	

4.4.2 Native Gelelektrophorese

Die native Gelelektrophorese funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie die herkömmliche SDS-PAGE, nur unterbleibt eine Denaturierung der Proteine durch SDS, β-Mercaptoethanol oder Erhitzen. Daher können Proteine, die als Komplex vorliegen, detektiert werden.

Es werden ein 7,5%iges Trenngel und ein 3,75%iges Sammelgel gegossen. Die Proben werden mit nativem 4x Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese wird im Sammelgel bei 15 mA, im Trenngel bei 20 mA in 1x N-PAGE-Puffer durchgeführt.

Sammelgel

Acrylamid	3,75% (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,1% (w/v)
Tris/HCL, pH 6,8	125 mM
Ammoniumpersulfat	0,04% (w/v)
TEMED	0,1% (v/v)
<i>aqua dest</i>	

Trenngel

Acrylamid	7,5% (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,21% (w/v)
Tris/HCL, pH 8,8	370 mM
Glycerin	5% (v/v)
Ammoniumpersulfat	0,1% (w/v)
TEMED	0,1% (v/v)
<i>aqua dest</i>	

nativer Probenpuffer pH 6,8

Tris/HCL	200 mM
Glycerin	40% (v/v)
Bromphenolblau	0.01% (w/v)
<i>aqua dest</i>	

10x N-PAGE-Puffer

Glycin	2 M
Tris	250 mM
<i>aqua dest</i>	

4.4.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Zur Anfärbung der aufgetrennten Proteine in einem Polyacrylamidgel (s. 4.4.1/4.4.2), wird dieses für 30 min in saurer Coomassie-Lösung auf dem Schwenktisch inkubiert. Anschließend wird mit einer Entfärber-Lösung der überschüssige Farbstoff ausgewaschen, bis die Proteinbanden gut sichtbar sind. Nach Neutralisierung in *aqua dest* wird das Gel mit einem Gelrockner getrocknet.

Coomassie-Lösung

Coomassie Brilliant Blue R250	1% (w/v)
Ethanol	40% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)
<i>aqua dest</i>	

Entfärber

Essigsäure	10% (v/v)
Ethanol	40% (v/v)
<i>aqua dest</i>	

4.4.4 Aufreinigung von bakteriell exprimierten Proteinen

Die Aufreinigung von Proteinen über ein GST-Epitop beruht auf der Interaktion der Glutathion-S-Transferase mit ihrem Substrat Glutathion, das an eine Säulenmatrix gebunden ist. Nach Waschschritten zum Entfernen von Proteinen, die nicht epitop-markiert sind, erfolgt die Elution durch Zugabe von Glutathion im Überschuß.

Zur Expression der Proteine wird eine üN-Kultur *E.coli* BL21, die ein pGEX-Plasmid mit dem Zielgen tragen, in 1 l LB-Amp bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Anschließend wird die Expression der GST-Fusionsproteine durch Zugabe von 0,2 mM IPTG induziert und die Bakterien für 2 h bei 32°C inkubiert. Nach Zentrifugation (5.000 rpm, 10 min, 4°C) werden die Bakterien in 40 ml GST-Bindungspuffer mit 10 mg/ml Lysozym resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Aufschluß über Ultraschall (30 s, 4°C) werden die unlöslichen Zelltrümmer sedimentiert (40 min, 10.000 rpm, 4°C) und die Proteinlösung über

einen 0,45 µm Filter auf eine 1 ml GSTrap-Säule (Amersham Bioscience, Freiburg) geladen. Die Aufreinigung findet über eine ÄKTA Prime Chromatographie-Anlage (Amersham Bioscience, Freiburg) nach Hersteller-Angaben statt. Das Protein wird in 10 ml GST-Elutionspuffer eluiert und als Fraktionen von je 1 ml gesammelt.

Im Fall einer Abspaltung des GST-Epitops wird der Elutionsschritt unterlassen und das Protein auf der Säule üN mit 80 U PreScission ProteaseTM (Amersham Bioscience, Freiburg) in PreScission-Puffer inkubiert. Im Anschluß werden die abgespaltenen Proteine in 10 Fraktionen von je 1 ml PreScission-Puffer manuell eluiert und dann der Elutionsschritt des GST-Programms zur Entfernung der noch auf der Säule befindlichen GST-Anteile durchgeführt.

Erhaltene Fraktionen werden über SDS-PAGE (s. 4.4.1) und Coomassie-Färbung (s. 4.4.3) auf Proteingehalt und Reinheit überprüft. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

GST-Bindungspuffer pH 7,3

Na-Phosphat	20 mM
NaCl	150 mM
DnaseI	1 µg/ml
Leupeptin	1 µg/ml
Aprotinin	1 µg/ml
Pepstatin	1 µg/ml
<i>aqua dest</i>	

GST-Elutionspuffer pH 8,0

Tris	50 mM
Glutathion	10 mM
<i>aqua dest</i>	

PreScission-Puffer pH 7,0

Tris	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
DTT	1mM
<i>aqua dest</i>	

4.4.5 Aufreinigung von Baculovirus exprimierten Proteinen

Rekombinante Baculoviren ermöglichen die Expression von einklonierten Genen über einen Polyhedrin-Promoter, was für eine effiziente Expression des gewünschten Proteins in Insektenzellen sorgt.

Vierzehn 175 cm² Flaschen High5-Zellen werden mit je 4 ml Baculovirus-Stocklösung infiziert (s. 4.1.9). Die Zellen werden 48 h p.i. abgelöst und sedimentiert (3.000 rpm, 10 min, 4°C). Das Sediment wird in 40 ml Kationenaustauscher-Puffer aufgenommen und durch 30 s Ultraschall-Behandlung aufgeschlossen. Die Zelltrümmer werden sedimentiert (10.000 rpm, 40 min, 4°C) und das Zelllysats über einen 0,45 µm Filter auf eine Kationenaustauscher-Säule geladen (HiTrap SP HP, 1 m Volumen; Amersham Bioscience, Freiburg). Die Aufreinigung findet über eine ÄKTA Prime Chromatographie-Anlage (Amersham Bioscience, Freiburg) nach Angaben des Herstellers statt. Das Protein wird über einen linearen Salzgradienten (50 mM – 2 M NaCl) in 40 Fraktionen von je 1 ml eluiert.

Die erhaltenen Fraktionen werden über SDS-PAGE (s. 4.4.1) und Coomassie-Färbung (s. 4.4.3) auf ihren Proteingehalt überprüft. Fraktionen, die das gewünschte Protein enthalten, werden in einem zweiten Reinigungsschritt auf eine HiLoad 16/60 SuperdexTM 200 Pregrade Gelpermeationssäule gegeben und einer Größenausschluß-Chromatographie unterzogen. Dazu wird eine ÄKTA FPLC (Amersham Bioscience, Freiburg) nach Hersteller-Angaben verwendet. Es werden 70 1,5 ml Fraktionen in Hepes-Puffer gesammelt und über SDS-PAGE (s. 4.4.1) und Coomassie-Färbung (s. 4.4.3) überprüft. Proteinhaltige Fraktionen werden aliquotiert und bei –80°C gelagert.

Kationen-Austauscher-Puffer pH 6,5

MES	20 mM
NaCl	150 mM
<i>aqua dest</i>	

Hepes-Puffer pH 7,4

HEPES	20 mM
NaCl	150 mM
<i>aqua dest</i>	

4.4.6 *in vitro* Translation von Proteinen

Bei der *in vitro* Translation werden Proteine in einem zellfreien System direkt von einem Expressionsplasmid in einer gekoppelten Transkriptions/Translations-Reaktion über einen T7-Promoter exprimiert. Dabei werden die Proteine durch Zugabe von [³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert.

1 µg Plasmid werden mit 20 µCi [³⁵S]-Methionin (Redivue™; Amersham Bioscience, Freiburg) und 20 µl TNT T7 Quick Master Mix (Promega, Mannheim) in einem Gesamtvolumen von 25 µl für 90 min bei 30°C inkubiert. Die Proteine werden im Anschluß direkt für Bindungsexperimente eingesetzt.

4.4.7 Sedimentation von Proteinen über Sucrosegradienten

Proteine, die auf einem Sucrose-Gradienten sedimentiert werden, flotieren je nach ihrem Molekulargewicht und ihrem Stokes-Radius, d. h. ihrer Form, dort, wo sich Zentrifugalkraft und Reibungswiderstand plus Auftrieb ausgleichen. Um eine ungefähre Aussage über die Größe eines Proteins treffen zu können, werden daher parallel Markerproteine mitgeführt, die im Einklang mit ihrem tatsächlichen Molekulargewicht sedimentieren.

10 ml 5-30% (w/v) Sucrose in 150 mM Tris/HCl pH 7,5 werden über einen Gradientenmischer auf 500 µl 40% (w/v) Sucrose geladen. Die Proteine werden vorsichtig auf den Gradienten überschichtet und für 16 h bei 100.000 x g und 4°C in einem SW41-Rotor (Beckmann, Frankfurt) sedimentiert. Im Anschluß werden durch Punktierung am Boden des Zentrifugen-Röhrchens Fraktionen unterschiedlicher Dichte gesammelt (10x 1 ml).

4.4.8 Crosslinking von Proteinen mit Glutaraldehyd

Glutaraldehyd vernetzt im Komplex vorliegende Proteine durch kovalente Verbindung von Hydroxyl-Gruppen, so dass die Monomere im SDS-Gel nicht mehr aufgetrennt werden können, und zeigt so Oligomerisierungen auf.

Je 30 µl Baculovirus exprimiertes Protein (s. 4.4.5) werden mit 6 µl PBS und 4 µl 0,1% (v/v) Glutaraldehyd für 0 min, 2 min, 5 min und 10 min bei RT inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 20 µl 4xPP beendet. Der Nachweis der Vernetzung erfolgt anschließend über SDS-PAGE (s. 4.4.1) und Immunoblot (s. 4.3.3).

4.4.9 *in vitro* Protein-Bindungsexperimente

GST-Fusionsproteine werden an Glutathion-Sepharose gekoppelt und mit einem potentiellen Interaktionspartner, der radioaktiv markiert ist, inkubiert. Im Fall einer Interaktion läßt sich das Protein über Bindung an den Komplex isolieren.

Vergleichbare Mengen an in *E. coli* exprimierter GST-Fusionsproteine (s. 4.4.4) werden mit 50 µl 50% (w/v) Glutathion-Sepharose 4B (Amersham Bioscience,

Freiburg) und GST-Assay-Puffer auf ein Volumen von 500 µl gebracht und für 30 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach 3x Waschen mit GST-Assay-Puffer (2.000 rpm 5 min) werden 20 µl *in vitro* translatiertes, [³⁵S]-radioaktiv markiertes Protein (s. 4.4.6) zugegeben und für weitere 2 h inkubiert. Nach erneutem Waschen wird das Sediment in 15 µl 4xPP aufgenommen und die Proteine durch Erhitzen auf 95°C für 5 min aus dem Komplex gelöst. Für die Auftrennung über SDS-PAGE (s. 4.4.1) werden zusätzlich 3 µl *in vitro* translatiertes Protein mitaufgetragen. Die Gele werden mit Coomassie-Lösung gefärbt und getrocknet (s. 4.4.3). Die autoradiographische Auswertung erfolgt durch Auflegen einer Bio-Imager-Platte und Analyse mit dem Bio-Image Reader BAS 1000 (Fujifilm, Düsseldorf).

GST-Assay-Puffer pH 7,3

HEPES	50 mM
NaCl	300 mM
Glycerin	10% (v/v)
Tween20	0,5% (v/v)
BSA	0,1% (w/v)
<i>aqua dest</i>	

4.4.10 *in vitro* DNA-Bindungsexperimente

Im *in vitro* DNA-Bindungs-Nachweis wird die Fähigkeit eines Proteins zur Bindung an dsDNA überprüft. Dazu werden 200 mg dsDNA-Zellulose (Sigma-Aldrich, Steinheim) auf eine Säule geladen und mit 2 ml DNA-Bindungspuffer äquilibriert. 20 µl [³⁵S]-radioaktiv markiertes Protein aus einer *in vitro* Translationsreaktion (s. 4.4.6) wird in 1 ml DNA-Bindungspuffer über die Säule gegeben und nach Waschen mit 5 ml DNA-Bindungspuffer in 0,5 ml Fraktionen mit steigenden Salzkonzentrationen (200, 400, 800 und 1500 mM NaCl) eluiert. Je 40 µl Eluat sowie 3 µl *in vitro* translatiertes Protein werden über SDS-PAGE (4.4.1) und Autoradiographie mit einem Bio-Image-Reader analysiert.

4.5 Elektronenmikroskopie

4.5.1 Einbettung von Zellen für die Elektronenmikroskopie

HFF-Zellen in 175 cm²-Flaschen werden in 6 ml 20 mM HEPES pH 7,4 mit 4% (w/v) Paraformaldehyd, 2,5% (v/v) Glutaraldehyd und 1% (w/v) Tannin geerntet und

für 90 min fixiert (nach Gelderblom et al., 1987). Nach 3x Waschen mit PBS (4.000 rpm, 5 min), Färbung mit 500 µl 1% (v/v) Osmiumtetroxid in PBS für 1 h und Dehydrierung mit 50% Ethanol für je 3x 5 min werden die Zellen für 30 min mit 0,2% (w/v) Uranylacetat in 70% Ethanol gefärbt, gefolgt von weiteren Dehydrierungsschritten mit 90% bzw. 100% Ethanol für je 3x 10 min. Im Anschluß werden die Zellen in Glycid-Ether 100 mit 1,5% (w/v) MNA in Beem-Kapseln® (Polyethylen-Kapseln mit pyramidenförmiger Spitze; Plano, Wetzlar) eingebettet. Zur Polymerisation werden die Proben für 48 h bei 60°C und 24 h bei 90°C inkubiert. Die Herstellung von Ultradünnschnitten erfolgt mit einem Ultramikrotom. Die Schnitte werden auf mit Pioloform beschichtete Kupfer-Netzchen mit Schlitzblenden (Plano, Wetzlar) übertragen, für 10 min mit 1% (w/v) Uranyl-Acetat in 40% Ethanol sowie für 10 min mit Bleizitrat angefärbt. Anschließend erfolgt die Analyse mit einem Zeiss Elektronenmikroskop EM T109 bei einer konstanten Spannung von 80 kV. Die Vergrößerung wird mit einem Kreuzgitter-Replika (2.160 Linien/mm) kalibriert.

4.5.2 Immunoelektronenmikroskopische Analyse (IEM)

Für IEM-Analysen werden Zellen zunächst fixiert und mit dem LR-Gold™ Resin System (Sigma-Aldrich, Steinheim) eingebettet. Dieses Harz mit niedriger Viskosität erlaubt anschließende immunologische Analysen von sonst fixationssensitiven Epitopen. Die Anfärbung der spezifischen Erstantikörper wird hier durch Konjugation der Zweitantikörper mit kolloidalem Gold ermöglicht, das durch seine Elektronendichte im EM gut sichtbar ist.

HFF-Zellen in 175 cm²-Flaschen werden mit AD169 infiziert (MOI=3, s. 4.1.4) und 72 h p.i. in 6 ml DMEM mit 4% (w/v) Paraformaldehyd für 90 min bei 4°C fixiert. Nach 2x Waschen mit DMEM (4.000 rpm, 5 min) folgt Quenchen in 500 µl 50 mM NH₄Cl in PBS für 30 min. Die Zellen werden 2x in PBS gewaschen, dehydriert und mit 0,2% (w/v) Uranylacetat angefärbt (s. 4.5.1). Die Einbettung folgt zunächst in LR-Gold 1:1 in Ethanol für 2x 1 h und 100 % LR-Gold 1 x 60 min sowie üN bei 4°C. Die Zellen werden in eine Beem-Kapsel® mit 100 % LR-Gold mit 0.1% (v/v) Benzoylperoxid (Benzid) als Initiator umgefüllt. Die Polymerisation findet bei -20°C unter UV-Bestrahlung für 3 Tage statt. Die Proben werden mit einem Ultramikrotom geschnitten und auf Nickel-Netzchen mit Schlitzblenden (Plano, Wetzlar) übertragen.

Für die Immunfärbung werden die Netzchen auf Tropfen der verwendeten Lösungen inkubiert. Zur Verdünnung der Antikörper wird TBS/3% BSA verwendet. Die Netzchen werden mit TBS/3% BSA für 10 min abgesättigt. Danach folgen Inkubation mit dem Erstantikörper für 30 min, waschen mit TBS, Inkubation mit dem Gold-konjugierten Zweitantikörper für 30 min, waschen mit TBS, waschen mit *aqua dest* und Kontrastieren mit 4 % (w/v) Uranylacetat. Die Auswertung erfolgt anschließend am Elektronenmikroskop (s. 4.5.1).

TBS pH 7.4

Tris/HCl	50 mM
NaCl	0.9%
<i>aqua dest</i>	

4.5.3 Negativkontrastierung von Einzelpartikeln

Strukturelle Details von Einzelpartikeln lassen sich durch Negativkontrastierung gut darstellen. Bei diesem Prozeß werden die Partikel mit einem elektronendichten Material umgeben, wobei durch den Kontrast der Färbung (schwarz) zu dem Material (weiß) die Oberfläche des Objektes sichtbar wird. Dazu wird Protein in Lösung nach Valentine et al. (1968) auf Kupfernetzchen mit 400 Maschen (Plano, Wetzlar) übertragen und mit Uranylacetat gefärbt.

Glimmerplättchen ($K_2OAl_2O_3SiO_2$) werden nach Hoppert und Holzenburg, 1998, indirekt mit einem Kohle-Film bedampft. Die verwendete Bedampfungsanlage Turbo Carbon Coater 208 (Cressington Scientific Instruments Ltd., Watford UK) wird mit einem Vakuum von $< 10^{-4}$ Bar betrieben.

Die Glimmerplättchen werden in einem Winkel von 30° für 30 s in 150 μ l Protein-Lösung (s. 4.4.5) getaucht, so dass die Kohle auf der Oberfläche flotiert und sich das Protein zwischen Kohle und Glimmer festsetzen kann. Im Anschluß wird das Präparat für 20 s in 4% Uranylacetat (w/v) getaucht, der Glimmer abgelöst und die Kupfernetzchen auf die flotierende Kohle aufgelegt. Nach 20 s werden die Kupfernetzchen von der Oberfläche abgenommen, überschüssige Flüssigkeit entfernt und getrocknet. Die Proteine werden im Elektronenmikroskop analysiert (s. 4.5.1).

5. Ergebnisse

5.1 Lokalisation von pUL104 in transient transfizierten 293T-Zellen

Um zu klären, ob pUL104 über ein eigenes nukleäres Lokalisationssignal (NLS) verfügt, oder auf eine Interaktion mit anderen viralen Proteinen angewiesen ist, wurden transiente Transfektionen in 293T-Zellen durchgeführt. Dazu wurde der UL104 ORF in das eukaryotische Expressionskonstrukt pcDNA3.1HisC kloniert. Dieser exprimiert Proteine mit einem N-terminalen XpressTM-Epitop, so dass pUL104 in transfizierten Zellen über indirekte Immunfluoreszenz mit dem Anti-ExpressTM-Antikörper nachgewiesen werden kann.

5.1.1 Klonierung von UL104 in pcDNA3.1HisC

Der Vektor pcDNA3.1HisC wurde durch die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NotI* linearisiert (s. 4.2.3) und anschließend dephosphoryliert (s. 4.2.4). Der gewünschte Leserahmen UL104 wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer UL104-hin/*EcoRI* und UL104-rück/*NotI* aus dem Cosmid pCM1028 amplifiziert (s. 4.2.10). Nach Spaltung des aufgereinigten PCR-Produkts mit *EcoRI* und *NotI* wurden Vektor und Insert ligiert (s. 4.2.7) und in *E.coli* XL1 blue transformiert (s. 4.2.9). Positive Klone wurden mit Ampicillin selektioniert und aus ihnen die Plasmid-DNA aufgereinigt (s. 4.2.1). Das fertige Konstrukt pcDNA-UL104 wurde durch eine Kontrollreaktion mit *EcoRI* und *NotI* und anschließende Analyse im Agarosegel (s. 4.2.8) sowie Sequenzierung mit den T7- und pcDNA-rück-Primern überprüft (s. 4.2.11).

5.1.2 Intrazelluläre Lokalisation von solitär exprimiertem pUL104

Für die Analyse der intrazellulären Lokalisation von solitär exprimiertem pUL104 wurde das Konstrukt pcDNA-UL104 unter Verwendung von LipofectamineTM 2000 in 293T-Zellen transfiziert (s. 4.1.5). Als Kontrolle wurde der Leervektor pcDNA3.1HisC transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenz mit dem Anti-

ExpressTM-Antikörper als Primärantikörper sowie einem Anti-Maus/Cy2-Antikörper als Sekundärantikörper durchgeführt (s. 4.3.2). Zur Darstellung der Zellkerne wurde der DNA-interkalierende Farbstoff TO-PRO[®]-3 eingesetzt. Der Nachweis der Fluoreszenz erfolgte über ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM).

Das mit XpressTM-Epitop markierte pUL104 ließ sich in homogener Verteilung in den Kernen transfizierter Zellen zeigen (Abb. 5.1 A), während in den mit Leervektor transfizierten Zellen kein Fluoreszenzsignal nachweisbar war (Abb. 5.1 B).

Infolgedessen wird pUL104 unabhängig von anderen viralen Proteinen in den Zellkern transportiert und besitzt demnach ein endogenes NLS.

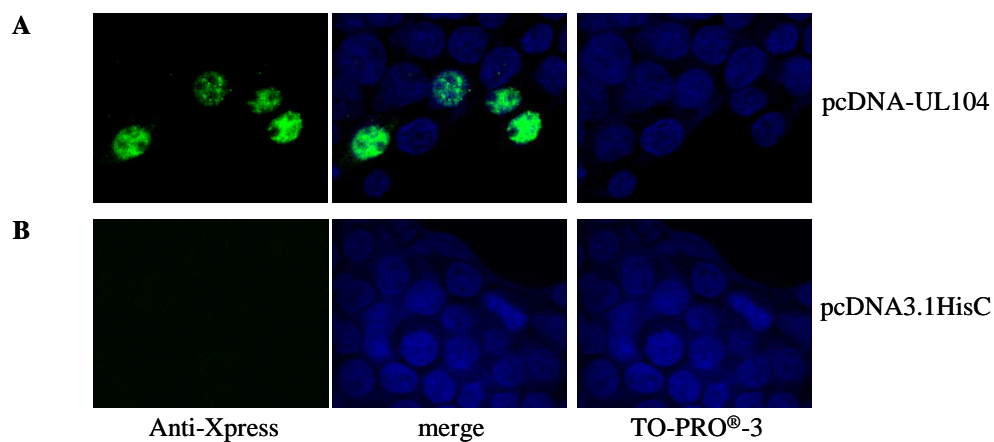


Abb. 5.1 Intrazelluläre Lokalisation von pUL104 in 293T-Zellen. Die Vektoren pcDNA-UL104 (A) bzw. pcDNA3.1HisC (B) wurden in 293T-Zellen transfiziert und 48 h.p.t. mit Paraformaldehyd fixiert. Der Nachweis von pUL104 erfolgte über indirekte Immunfluoreszenz mit einem Anti-XpressTM-Antikörper. Die Zellkerne wurden über den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff TO-PRO[®]-3 dargestellt.

5.2 Untersuchungen zur Lokalisation des pUL104 NLS

Da pUL104 nicht über eine Konsensus-NLS Sequenz verfügt (predictNLS Server: <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS>; Cokol et al., 2000), wurden überlappende Deletionsmutanten hergestellt, um die Lokalisation des pUL104-NLS einzugrenzen. Die Lokalisation der Mutanten wurde ebenfalls über indirekte Immunfluoreszenz überprüft.

5.2.1 Herstellung von pUL104 Deletionskonstrukten

Unter Verwendung von pcDNA-UL104 als Matrize wurden verschiedene UL104 Sequenzabschnitte über PCR amplifiziert (Tab. 5.1, s. 4.2.10). Die einzelnen PCR-Produkte wurden aufgereinigt (s. 4.2.6), mit *EcoRI* und *NotI* geschnitten (s. 4.2.3) und in den Vektor pcDNA3.1HisC ligiert (s. 4.2.7). Die erhaltenen Konstrukte wurden über eine Kontrollreaktion mit *EcoRI* und *NotI* sowie durch Sequenzierung mit den T7- und pcDNA-rück-Primern überprüft (s. 4.2.11).

Konstrukt	Primer hin	Primer rück	bp UL104
pcDNA-UL104del1	UL104-hin/ <i>EcoRI</i>	UL104Mi-rück/ <i>NotI</i>	1-1593
pcDNA-UL104del2	UL104Mi-hin/ <i>EcoRI</i>	UL104-rück/ <i>NotI</i>	591-2094
pcDNA-UL104Nt	UL104-hin/ <i>EcoRI</i>	UL104Nt-rück/ <i>NotI</i>	1-1047
pcDNA-UL104Mi	UL104Mi-hin/ <i>EcoRI</i>	UL104Mi-rück/ <i>NotI</i>	591-1593
pcDNA-UL104Ct	UL104Ct-hin/ <i>EcoRI</i>	UL104-rück/ <i>NotI</i>	1048-2094

Tab. 5.1 Zusammensetzung der pUL104-Deletionsmutanten. Auflistung der verwendeten Primer sowie der UL104-Sequenzabschnitte der hergestellten pUL104-Deletionskonstrukte.

5.2.2 Intrazelluläre Lokalisation der pUL104-Deletionsmutanten

Zur Darstellung der intrazellulären Verteilung der pUL104-Deletionsmutanten wurden die Konstrukte pcDNA-UL104del1, pcDNA-UL104del2, pcDNA-UL104Nt, pcDNA-UL104Mi und pcDNA-UL104Ct (Abb. 5.2 A) mit Hilfe der Lipofectamine-Methode transient in subkonfluente 293T-Zellen transfiziert (s. 4.1.5). Nach 48-stündiger Expression wurden die Zellen mittels Paraformaldehyd fixiert und einer indirekten Immunfluoreszenz unter Verwendung des Anti-XpressTM-Antikörpers und eines Anti-Maus/Cy2-Antikörpers unterzogen (s. 4.3.2). Die DNA der Zellkerne wurde mit TO-PRO[®]-3 gefärbt und die Fluoreszenz im LSM dargestellt.

Die Auswertung der Immunfluoreszenzpräparate ergab, dass durch die erzeugten Deletionen in jedem Fall eine Umverteilung des Proteins ins Zytoplasma bewirkt wurde (Abb. 5.2 B). Dies läßt darauf schließen, dass es sich bei dem pUL104-NLS um ein nichtlineares Epitop handelt. Weiterhin zeigt sich bei der Expression der C-terminalen Hälfte des Proteins, und in geringerem Maße auch bei der N-terminalen Hälfte, eine punktuelle Anhäufung der Fluoreszenz-Signale anstelle der diffusen Verteilung, die bei den übrigen Deletionen zu finden ist. Daher ist anzunehmen, dass diese beiden Deletionen zu einer Aggregation der Proteine führen.

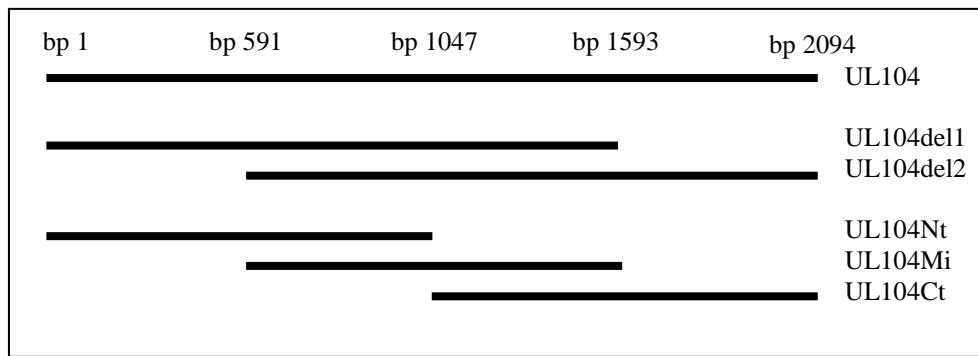
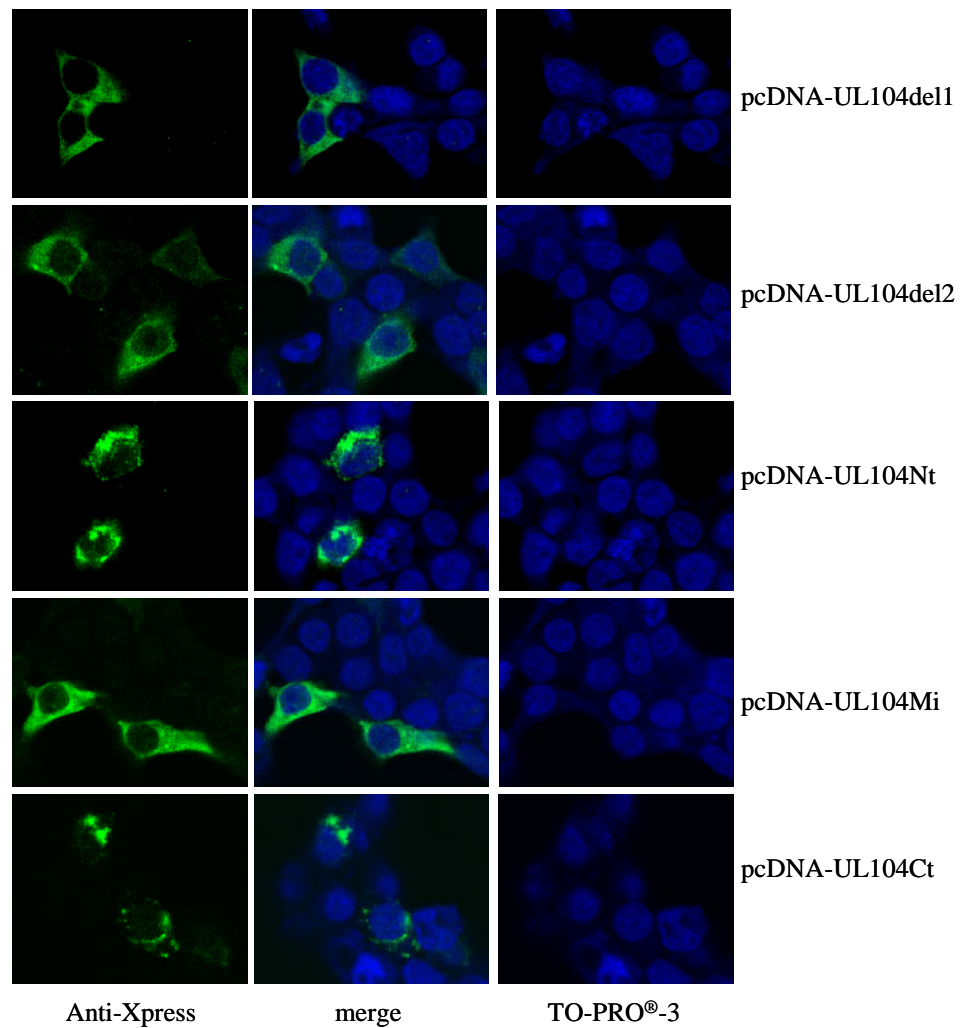
A**B**

Abb. 5.2 Darstellung der intrazellulären Verteilung der pUL104-Deletionsmutanten in 293T-Zellen. (A) Schematische Darstellung der Deletionen. (B) Die Konstrukte pcDNA-UL104del1, pcDNA-UL104del2, pcDNA-UL104Nt, pcDNA-UL104Mi und pcDNA-UL104Ct wurden in 293T-Zellen transfiziert und 48 h p.t. mit Paraformaldehyd fixiert. Die Expression der Proteine wurde über indirekte Immunfluoreszenz mit dem Anti-XpressTM-Antikörper nachgewiesen. Die Zellkerne wurden über den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff TO-PRO[®]-3 dargestellt.

5.3 Affinitätsreinigung von pUL104-Antikörpern

Um die Detektion von pUL104 in infizierten Zellen zu ermöglichen, wurden aus hochtitrigem HCMV-positivem Rekonvaleszentenserum anti-pUL104 Antikörper über Affinitätschromatographie isoliert. Dazu wurde bakteriell exprimiertes rekombinantes UL104 (rpUL104) über Esterbindung kovalent an eine Agarose-Matrix gebunden, mit dem Rekonvaleszentenserum inkubiert und die gebundenen Antikörper über eine Änderung des pH-Werts eluiert. Zur Expression wurde der Vektor pGEX6.1 verwendet, bei dem die Protein-Expression über ein lac-Operon regulierbar ist. Eine Aufreinigung der Proteine wird über ein GST-Fusionsprotein ermöglicht, das im Anschluß über die PreScission- ProteaseTM wieder entfernt werden kann.

5.3.1 Klonierung von UL104 in pGEX-6P-1

Der Vektor pGEX-6P-1 wurde durch die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NotI* linearisiert (s. 4.2.3) und anschließend dephosphoryliert (s. 4.2.4). Das gewünschte Insert UL104 wurde über *EcoRI* und *NotI* aus dem Konstrukt pcDNA-UL104 ausgeschnitten, über ein quantitatives Agarosegel isoliert (s. 4.2.8) und die DNA aufgereinigt (s. 4.2.5). Im Anschluß wurden Vektor und Insert ligiert (s. 4.2.7) und in *E.coli* XL1 blue kompetente Zellen transformiert (s. 4.2.9). Positive Klone wurden mit Ampicillin selektioniert, aus ihnen die Plasmid-DNA aufgereinigt (s. 4.2.1) und die Insertion von UL104 durch Kontrollspaltung mit *EcoRI* und *NotI* überprüft.

5.3.2 Affinitätsreinigung von anti-pUL104 Antikörpern

Das Konstrukt pGEX-UL104 wurde in *E.coli* BL21 Zellen eingebracht (s. 4.2.9) und das Protein exprimiert. Nach Aufschluß der Bakterien erfolgte eine Aufreinigung des Lysats über eine GSTrap-Säule mit anschließender Elution des GST-UL104 (s. 4.4.3). Gesammelte GST-UL104 Proteinfractionen (ca. 5 ml) wurden an die Affigel-Matrix gekoppelt und mit HCMV-positivem Rekonvaleszentenserum inkubiert (s. 4.3.1). Nach Elution wurde der erhaltene polyklonale Antikörper pAbUL104 auf seine Spezifität überprüft. Dazu wurden zum einen Streifenblots von aufgereinigtem rpUL104, dessen GST-Epitop mittels PreScission Protease entfernt wurde (s. 4.4.3) verwendet, zum anderen Westernblot-Streifen, die immundominante Epitope verschiedener abundanter HCMV-Proteine tragen und von Prof. Radsak, Universität

Marburg, zu Verfügung gestellt wurden (Eggers et al., 2001). Letztere enthalten die carboxy-terminale Hälfte des Tegumentproteins ppUL83 (pp65; 31 kDa), den Carboxyterminus von ppUL32 (pp150; 26 kDa), die interne AD-1 Domäne von gpUL55 (gB; 24 kDa) und den Aminoterminal von gpUL75 (gH; 20 kDa). Diese Streifen wurden jeweils mit HCMV positiven Serum, anti-pp65-, anti-gH- und anti-gB-Antikörpern sowie pAbUL104 inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit Peroxidase-konjugierten anti-human oder anti-Maus Sekundärantikörpern sowie mit ECL-Lösung zum Auslösen einer Chemolumineszenz-Reaktion (s. 4.3.3).

Ebenso wurde ein Aliquot des GST-UL104-Affigels nach SDS-PAGE einem Immunoblot mit HCMV positiven Serum unterzogen (Abb. 5.3 A). Dies bestätigt, dass in dem verwendeten Serum tatsächlich Antikörper gegen pUL104 vorhanden waren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass pAbUL104 im Westernblot nur mit dem aufgereinigten pUL104 interagiert (Abb. 5.3 B). Andere immundominante HCMV-Epitope ließen sich zwar mit ihren spezifischen Antikörpern nachweisen, wurden von pAbUL104 dagegen nicht erkannt (Abb. 5.3 C). Daher handelt es sich bei pAbUL104 um einen monospezifischen Antikörper gegen pUL104. Der Antikörper wurde in nachfolgenden Experimenten in einer 1:10 Verdünnung verwendet.

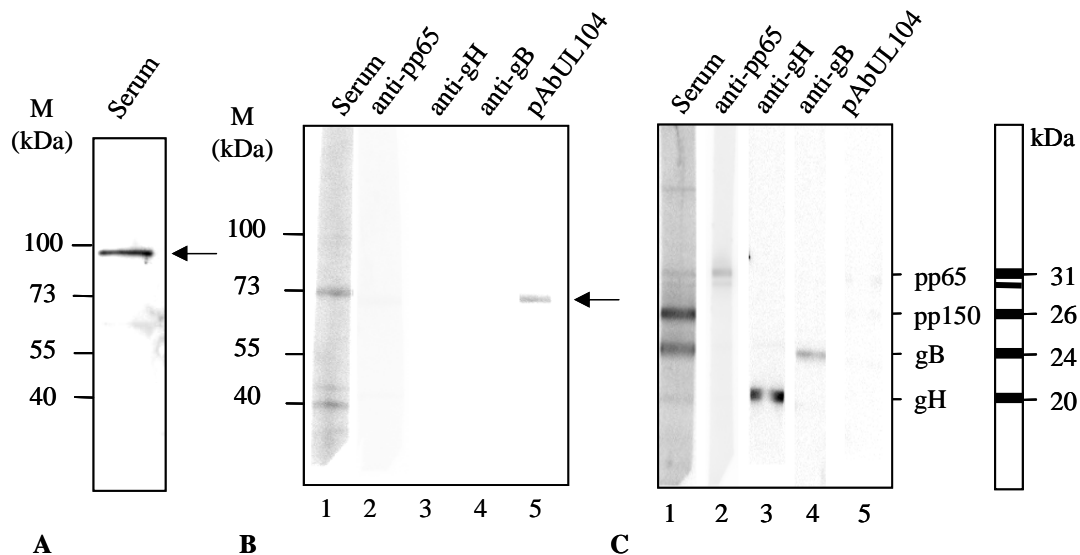


Abb. 5.3 Charakterisierung des gereinigten Antikörpers pAbUL104. (A) Ein Aliquot des GST-UL104-Affigels wurde mittels SDS-PAGE (8%) aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und in einer Immunfärbung mit HCMV positivem Serum behandelt. (B) Aufgereinigtes pUL104 bzw. (C) rekombinante Protein-Epitope von pp65 (31 kDa), pp150 (26 kDa), gB (24 kDa), und gH (20 kDa) wurden mittels SDS-PAGE (8% bzw. 11%) aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen, die im Immunoblot mit HCMV positivem Serum (Spur 1), anti pp65 (Spur 2), anti gH (Spur 3), anti gB (Spur 4) und pAbUL104 (Spur 5) inkubiert wurden.

5.4 Analyse der Expression von pUL104 in infizierten Zellen

Zur Identifizierung der UL104 Genprodukte wurden in infizierten Fibroblasten Immunpräzipitationen durchgeführt. Die Verteilung und Stabilität des Proteins wurde durch Zellfraktionierung untersucht. Um festzustellen, ob es sich bei pUL104 um ein Strukturprotein handelt, wurden weiterhin extrazelluläre Virionen auf pUL104 Präsenz überprüft. Die subzelluläre Lokalisation von pUL104 wurde über EM-Analysen nach Immuno-Gold-Färbung sowie im Verlauf des Infektionszyklus über indirekte Immunfluoreszenz analysiert. Hierbei wurde außerdem die Expression von pUL104 nach Zugabe von Phosphonoessigsäure (PAA), einem Inhibitor der viralen DNA-Replikation, untersucht.

5.4.1 Identifikation der Genprodukte von ORF UL104

AD169-infizierte oder mock-infizierte HFF (s. 4.1.4) wurden 72 h p.i. radioaktiv markiert und die gewonnenen Zellextrakte mit pAbUL104 immunpräzipitiert (s. 4.3.4). Die Auswertung der Proben erfolgte über SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie. In infizierten Zellen konnten zwei Proteine nachgewiesen werden, wohingegen in der Kontrolle kein Protein zu finden war (Abb. 5.4 A, Spuren 1 und 2). Das im Vergleich mit dem Größenstandard ermittelte Molekulargewicht von pUL104 korrespondiert mit ca. 73.000 mit dem theoretisch errechneten Gewicht von ca. 75.000. Die größere Form mit etwa 150 kDa könnte durch Dimerisierung von pUL104 entstanden sein. Die Reaktivität des Antikörpers mit beiden Proteinen wurde durch Preadsorption des Antiserums mit dem GST-UL104 Fusionsprotein gesenkt (Abb. 5.4 A, Spur 3), was bestätigt, dass es sich bei beiden Proteinen um Formen von pUL104 handelt. Als Ladungskontrolle wurde jeweils ein Aliquot der Zellextrakte ohne Immunpräzipitation ausgewertet (Abb. 5.4 B).

Darüber hinaus wurde je ein Aliquot der nicht-infizierten und AD169-infizierten Zellen nach Immunpräzipitation über 7,5%ige native Gelelektrophorese aufgetrennt (s. 4.4.2) und die präzipitierten Proteine über Autoradiographie nachgewiesen (Abb. 5.4 C). Unter diesen Bedingungen konnte nur ein Signal detektiert werden, was darauf hindeutet, dass es sich bei den 73 und 150 kDa Formen von pUL104 um Bestandteile eines Komplexes handelt.

Es handelt sich bei pUL104 also um ein Monomer von ca. 73 kDa mit einer Tendenz zur Dimerisierung, das unter nativen Bedingungen als Oligomer vorliegt.

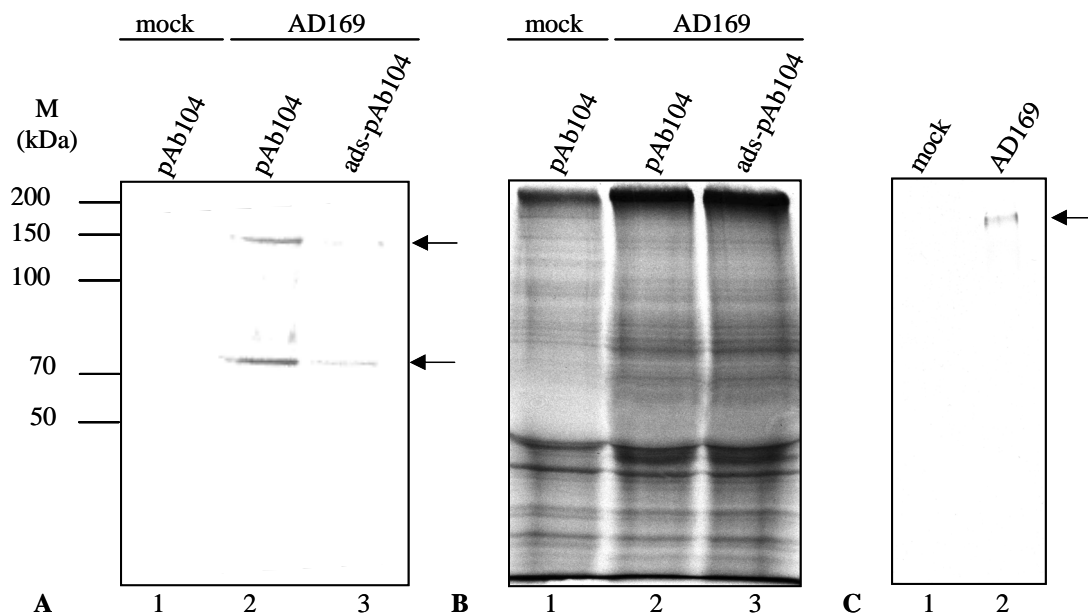


Abb. 5.4 Identifizierung von HCMV pUL104. (A) Nicht-infizierte (Spur 1) oder AD169-infizierte (Spuren 2 und 3) HFF wurden 60 h p.i. mit 50 $\mu\text{Ci/mL}$ [^{35}S]-Methionin für 12 h radioaktiv markiert. 72 h p.i. wurden die Zellen mit pAbUL104 (Spuren 1 und 2) oder preadpAbUL104 (Spur 3) immunpräzipitiert. Es folgten SDS-PAGE (8%) und Autoradiographie. (B) Als Ladungskontrolle wurden Aliquots der in A und C verwendeten Extrakte ebenfalls einer SDS-PAGE (8%) und Autoradiographie unterzogen. (C) Aliquots der präzipitierten Extrakte von (A) Spur 1 und 2 wurden für ein 7,5%ige native Gel-Electrophorese verwendet, gefolgt von Autoradiographie.

5.4.2 Subzelluläre Verteilung von pUL104

AD169-infizierte oder mock-infizierte HFF (s. 4.1.4) wurden 72 h p.i. für 1 h mit 50 $\mu\text{Ci/mL}$ [^{35}S]-Methionin radioaktiv markiert. Im Anschluß wurden die Zellen geerntet (pulse) oder für 0,5, 1 bzw. 3 h ohne Radioaktivität inkubiert (chase). Aus den erhaltenen Ansätzen wurden Homogenat-, Zytoplasma- und Kern-Fractionen präpariert (s. 4.1.7) und mit pAbUL104 immunpräzipitiert (4.3.4). Die Auswertung der Proben erfolgte über SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie.

In allen Fractionen außer der Kontrolle läßt sich sowohl die pUL104 monomere als auch die dimere Form nachweisen (Abb.5.5). Trotz seiner primären Kernlokalisation (s. 5.1) ist pUL104 in infizierten Zellen also auch im Zytoplasma vorhanden. In den Homogenatfractionen (Abb. 5.5 A) haben beide pUL104 Formen etwa die gleiche Verteilung, während die Zytoplasmafractionen (Abb. 5.5 B) vermehrt das Dimer, die Kernfractionen (Abb. 5.5 C) dagegen vermehrt das Monomer aufweisen. Die Bandenstärke zeigt eine deutliche Abnahme für die 3 h Werte, was auf einen Abbau

des Proteins zu diesem Zeitpunkt hindeutet. Einzige Ausnahme ist hier die dimere Form in der Kernfraktion, die von der Stärke her zunimmt. Es ist daher anzunehmen, dass im Laufe der Zeit ein Übergang vom Monomer zum Dimer stattfindet.

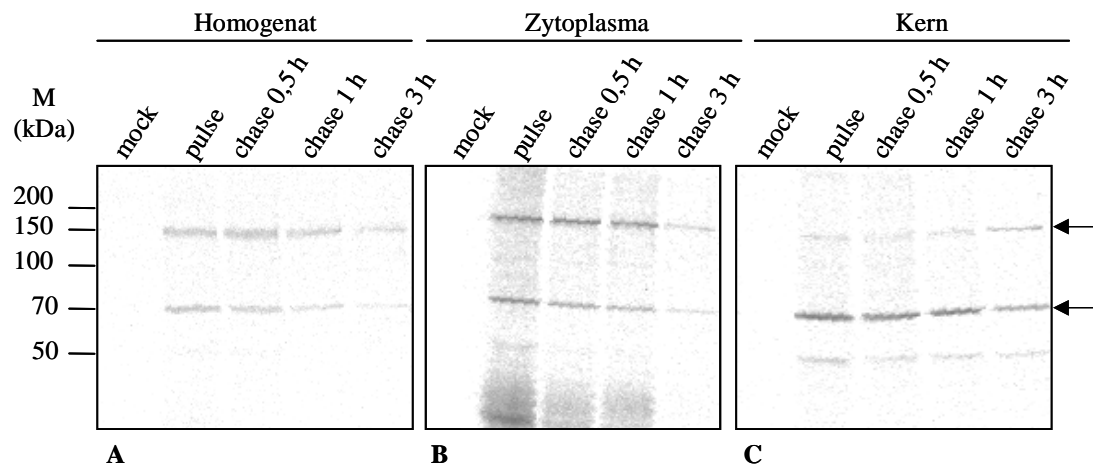


Abb. 5.5 Verteilung von pUL104 bei Pulse-Chase-Experimenten in verschiedenen Zellfraktionen. Nicht-infizierte oder HCMV AD169-infizierte HFF wurden 72 h p.i. mit 60 $\mu\text{Ci/mL}$ [^{35}S]-Methionin für 1 h radioaktiv markiert und für 0,5, 1 oder 3 h ohne Radioaktivität inkubiert. Die Zellen wurden fraktioniert und mit pAbUL104 immunpräzipitiert. Daran wurden SDS-PAGE (8%) und Autoradiographie angeschlossen.

5.4.3. Nachweis von pUL104 in Virionen

Nicht-infizierte Zellen oder isolierte extrazelluläre Virionen (s. 4.1.8) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt (s. 4.4.1), auf Nitrocellulose übertragen und pUL104 mit pAbUL104 im Immunoblot nachgewiesen (s. 4.3.3).

Während in der Negativkontrolle kein Signal zu erkennen ist, lassen sich beide pUL104 Formen in Virionen nachweisen (Abb. 5.6), wobei die dimere Form dominant ist. Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei pUL104 um ein Strukturprotein handelt.

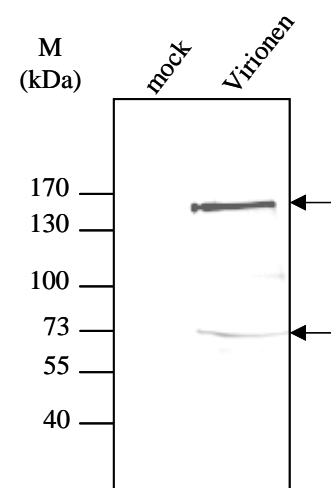


Abb. 5.6 Nachweis von pUL104 in Virionen. Nicht-infizierte HFF oder extrazelluläre Virionen wurden mittels SDS-PAGE (8%) aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Im Anschluß wurde ein Immunoblot mit pAbUL104 durchgeführt.

5.4.4 EM-Analyse der pUL104 Lokalisation in infizierten Zellen

AD169-infizierte HFF (MOI=3; s. 4.1.4) wurden 72 h p.i. eingebettet, zu Ultradünnschnitten verarbeitet und auf Nickelnetzchen übertragen. Dann erfolgte eine indirekte Immunfärbung mit pAbUL104 bzw. einem Antikörper gegen den HCMV-Prozessivitätsfaktor Anti-pUL44 (RG1202) gefolgt von 12 nm bzw. 4 nm Gold-konjugierten anti-Human bzw. anti-Maus Sekundärantikörpern (s. 4.5.2). EM-Aufnahmen wurden mit einem Zeiss EM T109 Elektronenmikroskop mit einer kalibrierten Vergrößerung von 25200x angefertigt und eingescannt.

Die Abbildungen 5.7 A und C zeigen intranukleäre HCMV Replikationszentren und umliegende Kapside. pUL104 ist sowohl im elektronendichten Material der Replikationszentren als auch singularär an Kapsiden zu finden (Abb. 5.7 A und B). Dagegen ist pUL44 wie erwartet nur mit den Replikationszentren (Abb. 5.7 C), aber nicht mit Kapsiden assoziiert (Abb. 5.7 D).

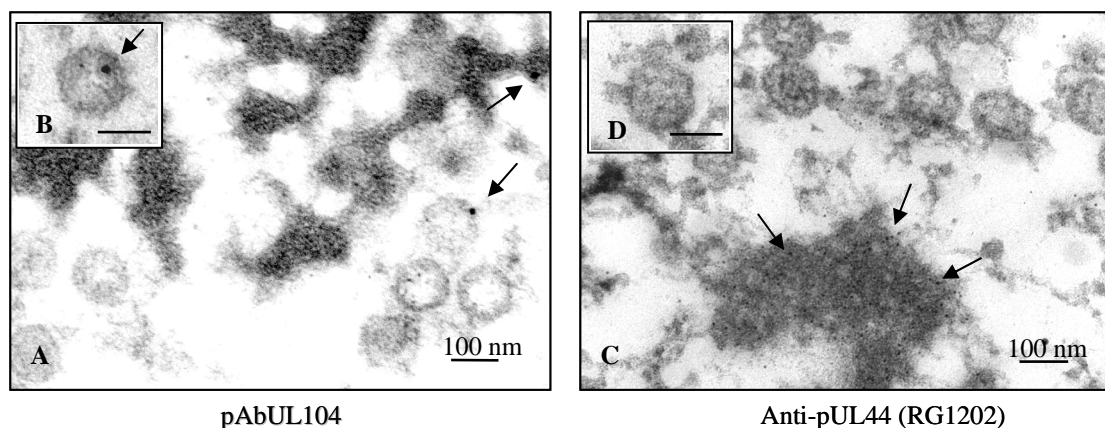


Abb. 5.7 EM-Analyse von Ultradünnschnitten AD169-infizierter HFF nach Immunogold-Färbung. AD169 infizierte HFF wurden 72 h p.i. eingebettet, geschnitten und mit pAbUL104 (A und B) bzw. RG1202 (anti-pUL44; C und D) sowie Gold-konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert. Der Größenstandard entspricht 100 nm.

5.4.5 Lokalisation von pUL104 im Infektionsverlauf

HFF-Deckglaskulturen wurden nicht oder mit AD169 infiziert (MOI=3, s. 4.1.4) und 12, 24, 48 und 72 h p.i. fixiert. Weiterhin wurden in Anwesenheit von 200 µg/ml PAA nicht- oder AD169-infizierte HFF-Deckglaskulturen 72 h p.i. fixiert. Eine indirekte Immunfluoreszenz wurde mit pAbUL104 und mAb63-27 gegen IE1 sowie mit Anti-Human/Cy3- und Anti-Maus/Cy2-Sekundärantikörpern durchgeführt (s.

4.3.2) und mit einem Epifluoreszenzmikroskop und einer Digitalkamera dokumentiert. Die Zellen wurden über Phasenkontrast-Aufnahmen dargestellt (PK). Im Infektionsverlauf ist pUL104 ab 12 h p.i. in diffuser Verteilung im Zellkern nachweisbar. Es beginnt 24 h p.i. in ring- oder punktförmigen Strukturen zu aggregieren, die sich ab 48 h p.i. zu größeren Formationen ausweiten. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um die HCMV Replikationszentren. Ab 72 h p.i. ist pUL104 auch im Zytoplasma in perinukleären Ansammlungen sowie punktuell verteilt zu finden, vermutlich als Bestandteil reifender Virionen. Wie erwartet ist die IE1-Anfärbung zu allen beobachteten Zeitpunkten auf den Zellkern beschränkt. In nicht-infizierten Zellen sind keine Immunfluoreszenzsignale zu beobachten (Abb. 5.8 A). In Anwesenheit von PAA dagegen beschränkt sich die pUL104 Verteilung 72 h p.i. auf eine teils diffuse, teils punktförmige Verteilung im Zellkern. Auch hier ist IE1 im Zellkern zu sehen, während die nicht-infizierten Zellen kein Signal zeigen (Abb. 5.8 B). pUL104 ist daher für seine spezifische Verteilung während der Infektion auf die virale DNA-Replikation angewiesen.

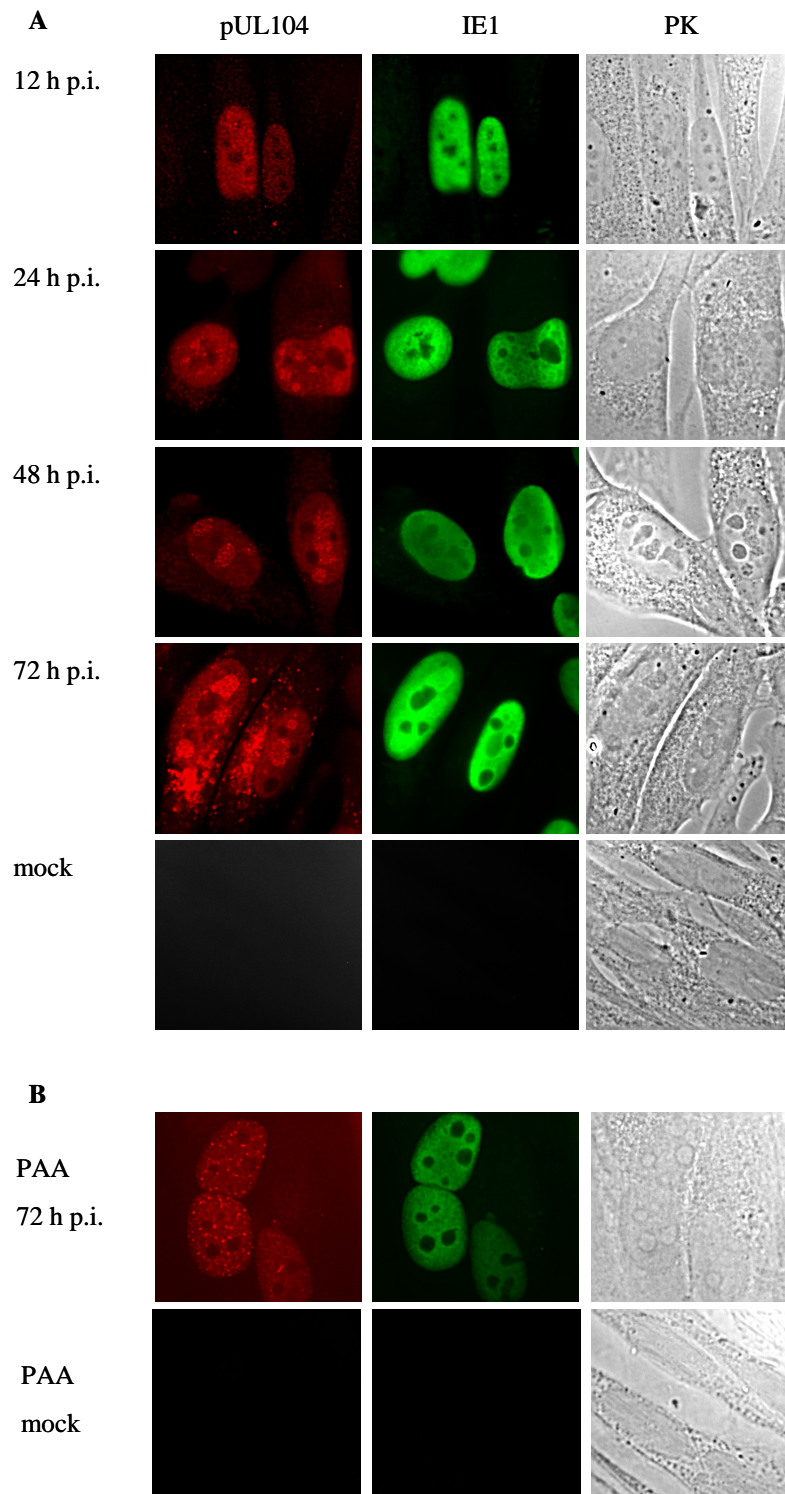


Abb. 5.8 Analyse der intrazellulären Verteilung von pUL104. Nicht- und AD169-infizierte HFF wurden 12, 24, 48 und 72 h p.i. (**A**) bzw. nach Zugabe von 200 µg/ml PAA 72 h p.i. (**B**) fixiert. Eine indirekte Immunfluoreszenz wurde mit pAbUL104 und mAb63-27 (anti-IE1) sowie Anti-Human/Cy3 und Anti-Maus/Cy2-Sekundärantikörpern durchgeführt. Die Darstellung der Zellen erfolgte über Phasenkontrast-Aufnahmen.

5.5 Untersuchungen zur Struktur von pUL104

Um genauere Aussagen über die Oligomerisation von pUL104 sowie dessen Molekulargewicht treffen zu können, wurden Sedimentations-Analysen von aufgereinigtem rpUL104 über Sucrosegradienten und Gelpermeations-Chromatographie durchgeführt. Da für die Gelpermeations-Chromatographie größere Proteinmengen benötigt wurden, wurde UL104 in ein Baculovirus eingebracht. Rekombinantes pUL104 konnte dann in High5-Zellen exprimiert und nach einem ersten Reinigungsschritt über einen Kationenaustauscher in der Gelpermeations-Chromatographie aufgetrennt werden. Mit dem so erhaltenen rpUL104 wurde außerdem die Multimerisierung von rpUL104 durch crosslinking mit Glutaraldehyd aufgezeigt. Glutaraldehyd vernetzt im Komplex vorliegende Proteine irreversibel über ihre Hydroxyl-Gruppen. Weiterhin ließen sich erste Daten zur Struktur des Komplexes durch EM-Analysen von rpUL104 Einzelpartikeln erbringen.

5.5.1 Größenbestimmung von pUL104 über Sedimentation

Bakteriell exprimiertes GST-UL104 wurde über Affinitätschromatographie aufgereinigt und der GST-Epitop mit Hilfe der PreScission ProteaseTM entfernt (s. 4.4.4). Im Anschluß wurden 500 µg des rpUL104 Proteins auf einen 5-30% (w/v) Sucrosegradienten überschichtet und sedimentiert (s. 4.4.7). In einem parallelen Ansatz wurde ein Sedimentations-Standard durch Verwendung von je 200 µg Markerproteinen (Amersham Biosciences, Freiburg) erstellt: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa und 880 kDa), Katalase (232 kDa) und Aldolase (158 kDa). Die Gradienten wurden in 10x 1 ml Fraktionen unterteilt und je 50 µl der einzelnen Proben über 7,5%ige native Gelelektrophorese aufgetrennt (s. 4.4.2). Die Markerproteine wurden über Coomassiefärbung sichtbar gemacht (s. 4.4.3), die pUL104-Fraktionen wurden einem Immunoblot mit pAbUL104 unterzogen (s. 4.3.3). Lediglich in der Fraktion 6 (Abb. 5.9 A, Spur 6) konnte rpUL104 nachgewiesen werden. Dies entspricht einem Sedimentationsgewicht nahe 669.000, basierend auf der Verteilung des Thyroglobulins im parallelen Gradienten (Abb. 5.9 B, Spur 6). Die mit 232 kDa und 158 kDa leichteren Proteine Katalase und Aldolase laufen dagegen in höheren Fraktionen. Dieses Ergebnis bietet damit einen weiteren Hinweis auf die Fähigkeit von pUL104 Komplexe mit hohem Molekulargewicht zu formen.

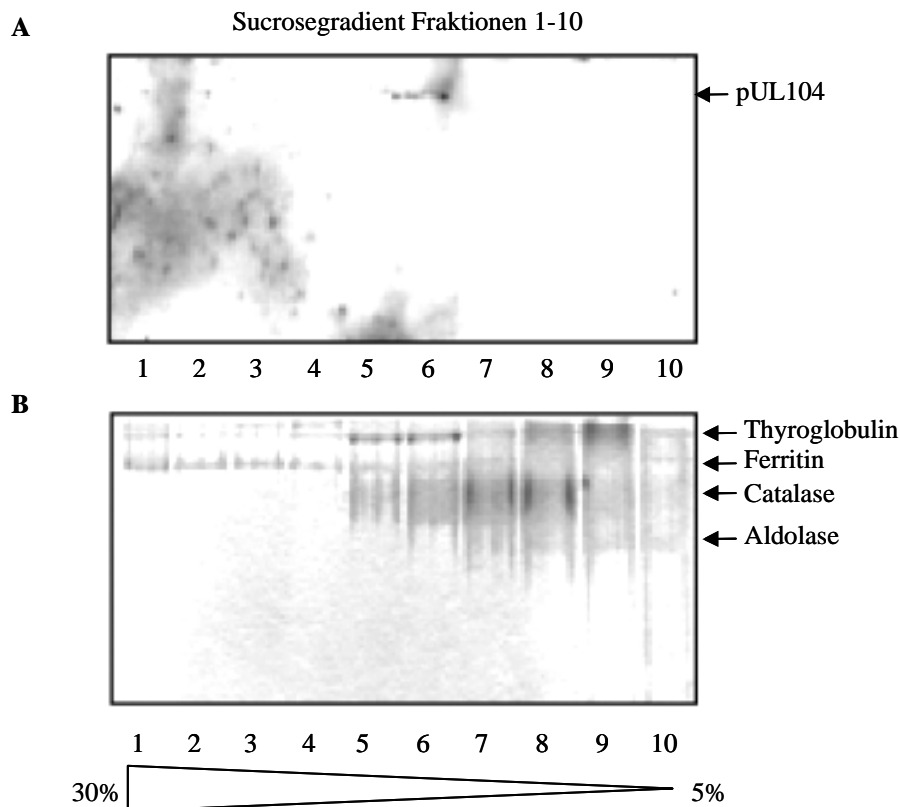


Abb. 5.9 Sedimentationsanalyse von pUL104. (A) rpUL104 wurde über einen 5%-30% (w/v) Sucrosegradienten sedimentiert. Die einzelnen Fraktionen wurden über 7,5%ige native Gelelektrophorese, Übertragung auf Nitrozellulose und Immunoblot mit pAbUL104 analysiert. (B) In einem parallelen Gradienten wurden Markerproteine (Thyroglobulin 669 kDa, Ferritin 440 kDa, Katalase 232 kDa, Aldolase 158 kDa) sedimentiert und nach Fraktionierung des Gradienten über 7,5%ige native Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung dargestellt.

5.5.2 Expression von rpUL104 über Baculoviren

Der Vektor pFastBACTMHT A wurde durch die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NotI* linearisiert (s. 4.2.3) und anschließend dephosphoryliert (s. 4.2.4). Das gewünschte Insert UL104 wurde ebenfalls über *EcoRI* und *NotI* aus dem Konstrukt pcDNA-UL104 ausgeschnitten, über ein quantitatives Agarosegel isoliert (s. 5.2.8) und die DNA aufgereinigt (s. 4.2.5). Im Anschluß wurden Vektor und Insert ligiert (s. 4.2.7) und in *E.coli* XL1 blue Zellen transformiert (s. 4.2.9). Über Selektion mit Ampicillin wurden positive Klone isoliert, aus ihnen die Plasmid-DNA aufgereinigt (s. 4.2.1) und die Insertion von UL104 durch Kontrollspaltung mit *EcoRI* und *NotI* überprüft.

Positive Klone wurden in *E.coli* DH10Bac Zellen transformiert, wo eine Transposition von UL104 in das Bacmid bMON14272, welches das Baculovirusgenom enthält, stattfinden kann. Nach Selektion von positiven Klonen über eine Gentamycin-Resistenz und Aufreinigung von Bacmid-DNA (s. 4.2.1) wurden durch Transfektion in High5-Zellen rekombinante Baculoviren erzeugt und

im Überstand freigesetzt (s. 4.1.9). High5-Zellen in 175 cm² Flaschen wurden mit 4 ml Virus-Stocklösung infiziert und die Zellen 48 h p.i. geerntet. Die erhaltenen Zelllysate wurden in einem ersten Schritt über einen Kationenaustauscher aufgereinigt, die rpUL104 enthaltenden Fraktionen in der Gelpermeations-Chromatographie aufgetrennt und die Proteine bei –80°C gelagert (s. 4.4.5).

5.5.3 Analyse von rpUL104 in der Gelpermeations-Chromatographie

Im Baculovirussystem exprimiertes rpUL104 (s. 5.5.2) wurde nach Aufreinigung über einen Kationenaustauscher über eine Gelpermeations-Chromatographie-Säule gegeben und die Proteine in 1,5 ml Fraktionen nach ihrer Größe aufgetrennt (s. 4.4.5). Die Elution der Proteine wurde über eine Messung der OD₂₈₀ aufgezeichnet. Als Referenz wurde ein Lauf mit Proteinen durchgeführt, deren Molekulargewicht sich mit ihrem Laufverhalten deckt: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Catalase (232 kDa) und Aldolase (158 kDa). Der Inhalt aller Fraktionen wurde über SDS-PAGE (s. 4.4.1) und Coomassiefärbung (s.4.4.3) überprüft.

Der hauptsächliche Anteil von rpUL104 wurde in den Fraktionen 23-25 eluiert (Abb. 5.10 B, Elutionsvolumen 33-39 ml) und liegt damit knapp vor der von Thyroglobulin erzeugten Spitze des OD₂₈₀-Werts im Kontrolllauf (Abb. 5.10 A). Damit läßt sich für das rpUL104 Oligomer ein Molekulargewicht von mindestens 669.000 annehmen. Da sich diese Fraktionen nicht mit herkömmlicher SDS-PAGE darstellen ließen, wurden sie über ein Harnstoffgel (s. 4.4.1) aufgetrennt und im Immunoblot (s. 4.4.3) mit pAbUL104 dargestellt. Nach Denaturierung mit Harnstoff ist rpUL104 wieder als Monomer von 73 kDa und als Dimer von 150 kDa sichtbar (Abb. 5.10 C). Monomeres rpUL104 wurde in den Fraktionen 44-48 (Elutionsvolumen 66-72 ml) eluiert und im Coomassiegel nachgewiesen (Abb. 5.10 D). Dies deutet darauf hin, dass die rpUL104 Monomerform zu stabilen oligomeren Komplexen organisiert wird, möglicherweise über eine Zwischenstufe als Dimer.

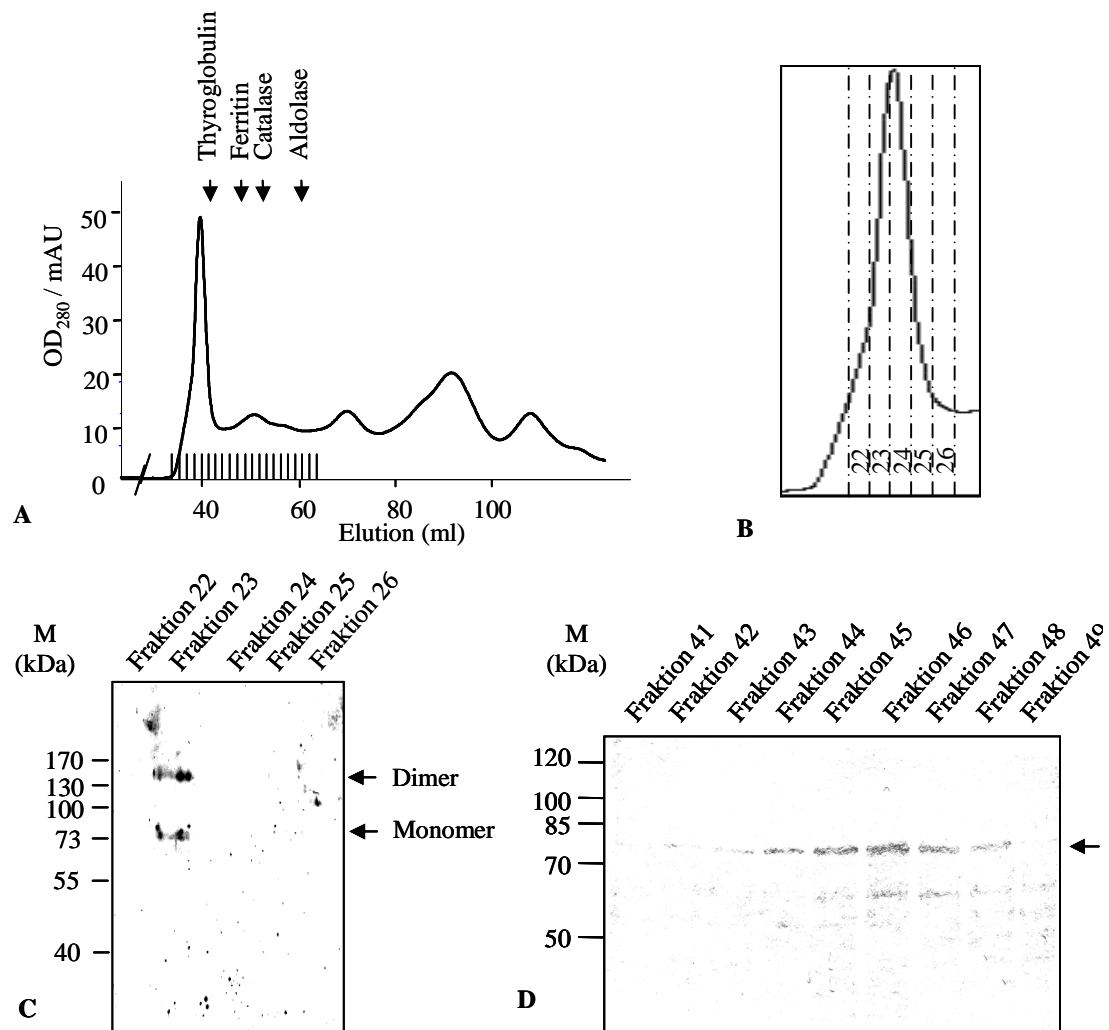


Abb. 5.10 Analyse der Oligomerstruktur von rpUL104. (A) Gelpermeations-Chromatographie von rpUL104. Aufgereinigtes rpUL104 wurde über eine HiLoad 16/60 Superdex 200 prepgrade Säule in einer ÄKTA FPLC aufgetrennt und die Elution durch OD₂₈₀-Messung aufgezeichnet. Die Säule wurde mit folgenden Markerproteinen kalibriert: Aldolase (158 kDa), Katalase (232 kDa), Ferritin (440 kDa) und Thyroglobulin (669 kDa), deren Elutionsverhalten durch Pfeile dargestellt ist. (B) Vergrößerter Ausschnitt von A zur Darstellung der *peak*-Fraktionen. (C) Analyse der *peak*-Fraktionen (22-26) im Harnstoffgel (8%) mit anschließendem Immunoblot unter Verwendung von pAbUL104. (D) Analyse der Fraktionen 41-49 über SDS-PAGE (8%) und Coomassie-Färbung.

5.5.4 Cross-Linking Analyse von rpUL104

Im Baculovirus-System exprimiertes, monomeres rpUL104 (5.5.3, Fraktion 45) wurde durch Zugabe von Glutaraldehyd vernetzt und die Reaktion nach 0 min, 2 min, 5 min und 10 min abgebrochen (s. 4.4.8). Die erhaltenen Reaktionsprodukte wurden über SDS-PAGE aufgetrennt (s. 4.4.1) und im Immunoblot mit pAbUL104 nachgewiesen (s. 4.3.3).

Die Ausgangsprobe zeigt das rpUL104 Monomer von 73 kDa, dessen Menge mit Einsetzen der Vernetzungsreaktion abnimmt (Abb. 5.11). Nach 2 min ist bereits die Dimerform von 150 kDa vorhanden, nach 5 min bzw. 10 min finden sich weitere Oligomerformen, deren Molekulargewicht den Markerbereich übersteigt. In Lösung befindliches rpUL104 akkumuliert mit der Zeit zu Komplexen mit hohem Molekulargewicht.

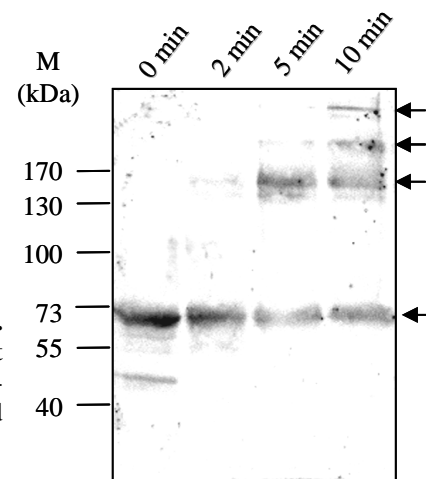


Abb. 5.11 Vernetzung von rpUL104 mit Glutaraldehyd. Aufgereinigtes rpUL104 wurde für 0, 2, 5 und 10 min mit Glutaraldehyd inkubiert. Die Ansätze wurden über SDS-PAGE (8%) aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und im Immunoblot mit pAbUL104 nachgewiesen.

5.5.5 Einzelpartikelanalyse von rpUL104

Aufgereinigtes oligomeres rpUL104 (5.5.3, Fraktion 23) wurde auf Kupfer-Netzchen aufgetragen und mit 4% (w/v) Uranylacetat kontrastiert (s. 4.5.3). Die EM-Bilder wurden mit einem Zeiss EM T109 Elektronenmikroskop bei einer kalibrierten Vergrößerung von 25.200x aufgenommen. Abbildung 5.12 A zeigt eine Übersichtsaufnahme, daneben sind vergrößerte Einzelaufnahmen zu sehen (Abb. 5.12 B). Es lassen sich ringförmige Aufsichten sowie leicht U- oder tonnenförmige Seitenansichten ausmachen. Die Proteine haben einen Durchmesser von 17,7 nm in der Höhe und 17,5 nm in der Breite. Da ein Volumen von 1.37 \AA^3 äquivalent zu 1 Da ist (Zipper et al, 1971), das rpUL104 Monomer jedoch mit einem errechneten Molekulargewicht von 75 kDa etwa 5 nm Durchmesser haben müsste, muß es sich bei den beobachteten Proteinen um Oligomere handeln.

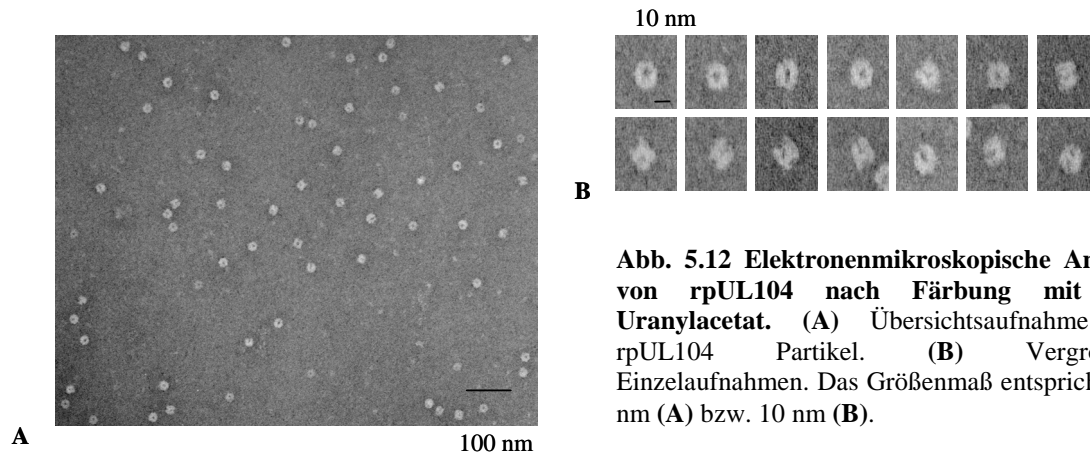


Abb. 5.12 Elektronenmikroskopische Analyse von rpUL104 nach Färbung mit 4% Uranylacetat. (A) Übersichtsaufnahme der rpUL104 Partikel. (B) Vergrößerte Einzelaufnahmen. Das Größenmaß entspricht 100 nm (A) bzw. 10 nm (B).

5.6 Interaktion von pUL104 mit Verpackungsproteinen

Zur Identifizierung von Interaktionspartnern von pUL104 wurden zunächst Co-Immunfluoreszenzen mit Antikörpern gegen folgende Proteine durchgeführt: pUL112/113, das für die Bildung von Replikationszentren verantwortlich ist; MCP, das den Hauptteil der Kapside darstellt; und pUL56, die große Untereinheit der HCMV Terminase. Zur genaueren Untersuchung der Interaktion mit der Terminase wurden *in vitro* Bindungsexperimente durchgeführt. Weiterhin wurde die Interaktion von pUL104 mit DNA in einem *in vitro* DNA-Bindungsassay überprüft.

5.6.1 Co-Lokalisation von pUL104 mit Verpackungsproteinen

AD169-infizierte HFF-Deckglaskulturen (MOI=3, s. 4.1.4) wurden 24, 48 und 72 h p.i. fixiert und in einer indirekten Immunfluoreszenz (s. 4.3.2) zunächst mit dem Antikörper gegen pUL112/113 mAb23 oder dem MCP-Antikörper mAb28-4 inkubiert, gefolgt von pAbUL104 und anschließender Inkubation mit Anti-Human/Cy3- und Anti-Maus/Cy2-Sekundärantikörpern. Nach Inkubation der Zellen mit dem pUL56-Antiserum pAbUL56 erfolgte zur Vermeidung von Kreuzreaktionen eine Absättigung mit unkonjugierten Ziege-anti-Human-Antikörpern, gefolgt von pAbUL104 und anschließender Verwendung von Anti-Human/Cy3- und Anti-Ziege/FITC-Sekundärantikörpern. Zur Darstellung der Immunfluoreszenzbilder wurde ein LSM verwendet.

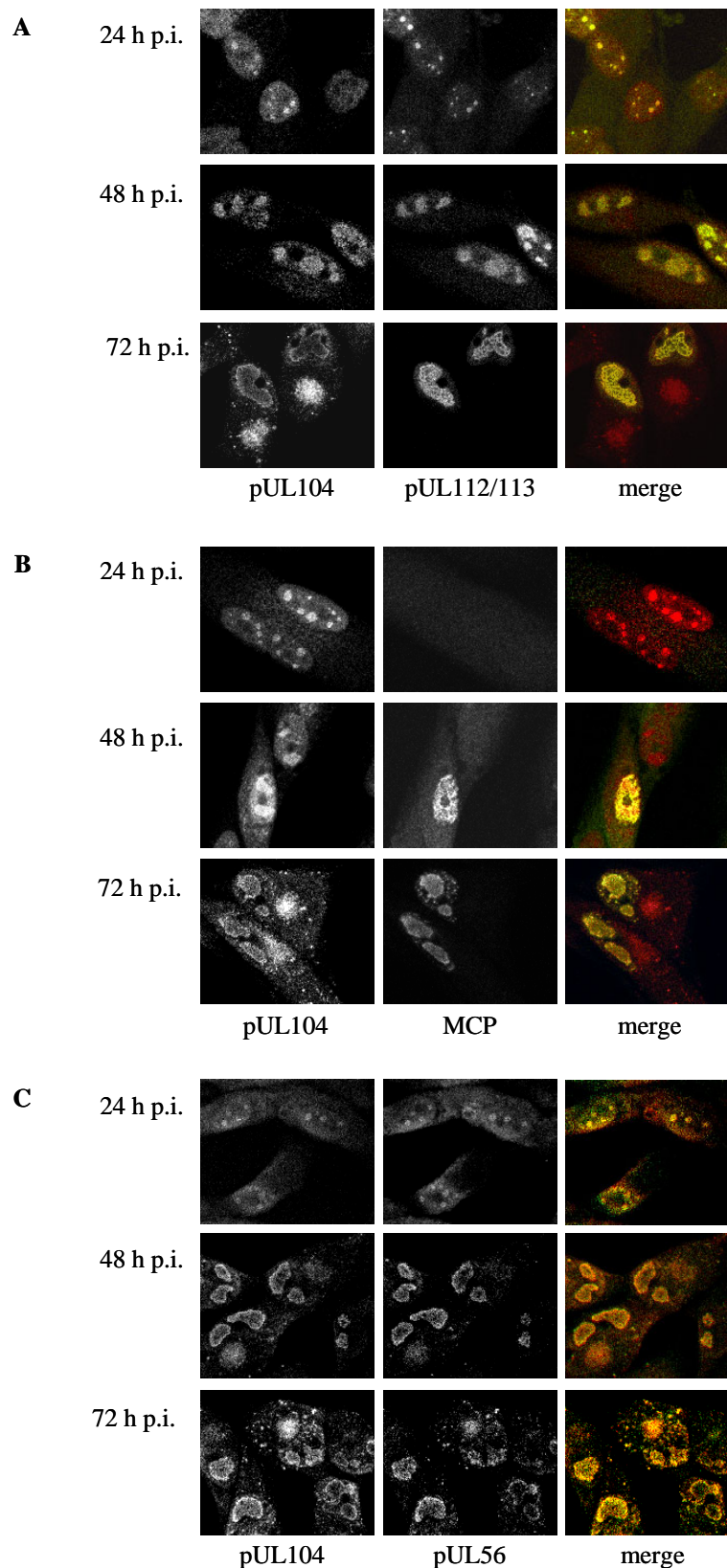


Abb. 5.13 Co-Immunfluoreszenz von pUL104 und Verpackungsproteinen. AD169-infizierte HFF wurden 24, 48 und 72 h p.i. fixiert und in einer indirekten Immunfluoreszenz einer Doppelfärbung mit pAbUL104 und mAbM23 gegen pUL112-113 (**A**), MA28-4 gegen MCP (**B**) oder pAbUL56 gegen die Terminase Untereinheit pUL56 (**C**) unterzogen. Im Anschluß folgte eine Inkubation mit Anti-Human/Cy3- und Anti-Maus/Cy2- (**A und B**) bzw. Human/Cy3- und Anti-Ziege/FITC-Sekundärantikörpern (**C**).

Während pUL112/113 schon 24 h p.i. in Präreplikationszentren gefunden werden kann (Abb. 5.13 A), zeigt pUL104 eine hauptsächlich diffuse Verteilung mit beginnender Rekrutierung zum äußeren Rand der Präreplikationszentren. Ab 48 h p.i. ist pUL104 dann in den durch pUL112/113 definierten Replikationszentren zu finden, wo es mit dem erst spät exprimierten MCP teilweise co-lokalisiert (Abb. 5.13 B). Dagegen läßt sich zu allen beobachteten Zeitpunkten eine enge Co-Lokalisation zwischen pUL104 und pUL56 feststellen (Abb. 5.13 C), was auf eine starke Assoziation beider Proteine hindeutet. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass pUL104 unabhängig von pUL112/113 in die Replikationszentren gelangt und mit pUL56 co-lokalisiert.

5.6.2 *in vitro* Interaktionsanalyse von pUL104 und der HCMV Terminase

Zur Untersuchung der physischen Interaktion zwischen pUL104 und den Terminase-Proteinen wurde ein *in vitro* Bindungsexperiment durchgeführt (s. 4.4.9). Dazu wurden bakteriell exprimierte GST-Fusionsproteine (s. 4.4.4), GST-UL56C, GST-UL56N und GSTUL89 bzw. GST allein an Glutathion-Sepharose gebunden. Diese wurden mit *in vitro* translatiertem [³⁵S]-Methionin markiertem pUL104 oder Luciferase (s. 4.4.6) inkubiert. Gebundenes Protein wurde über SDS-PAGE aufgetrennt (s. 4.4.1) und autoradiographisch nachgewiesen.

Wie in Abb. 5.14 A zu sehen ist, interagiert pUL104 spezifisch mit GST-pUL56C, das die C-terminale Hälfte von pUL56 umfasst, aber nicht mit GST allein. Mit GST-pUL56N sowie GST-pUL89 ist fast keine Interaktion zu beobachten. Die als Negativkontrolle verwendete Luciferase zeigt keinerlei Interaktion mit den GST-Proteinen (Abb. 5.14 B). Dieses Ergebnis läßt auf eine direkte Interaktion zwischen pUL104 und pUL56 schließen.

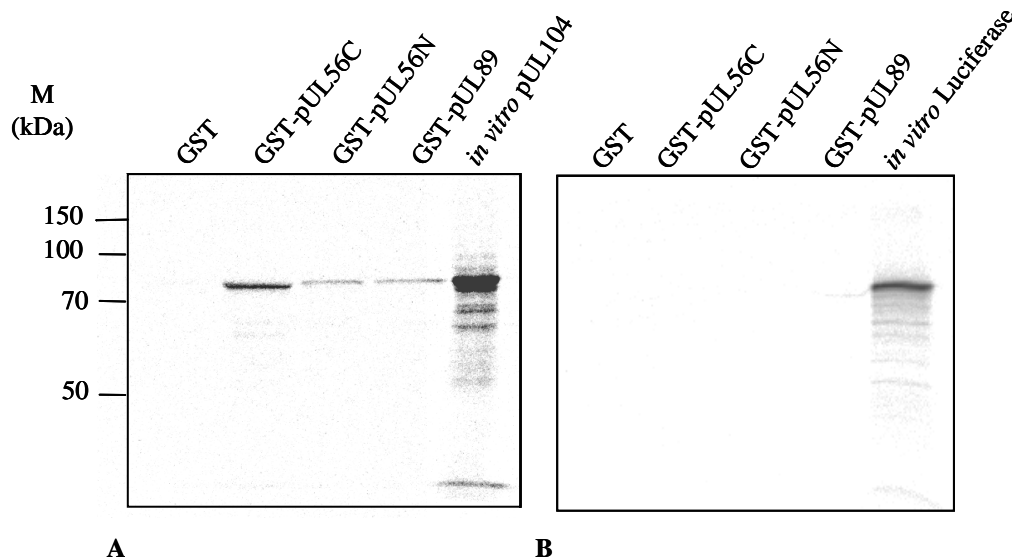


Abb. 5.14 *in vitro* Bindung von pUL104 an HCMV Terminase Proteine. Glutathion-Sepharose 4B wurde mit GST, GST-pUL56C, GST-pUL56N oder GST-pUL89 beladen und mit *in vitro* translatiertem (A) pUL104 (*in vitro* UL104) oder (B) Luciferase (*in vitro* luciferase) inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden über SDS-PAGE (8%) und anschließende Autoradiographie nachgewiesen.

5.6.3 Untersuchung der *in vitro* Bindung von pUL104 an DNA

Um festzustellen, ob pUL104 über die Fähigkeit zur DNA-Bindung verfügt, wurde *in vitro* translatiertes, mit [35 S]-Methionin markiertes pUL104 (s. 4.4.6) im Überschuß auf eine Säule mit einer Matrix aus DNA-Zellulose gegeben, die Säule gewaschen, und gebundenes Protein mit steigenden Salzkonzentrationen eluiert (s. 4.4.10). Als Negativkontrolle wurde *in vitro* translatiertes MCP verwendet. Der Proteingehalt der Eluat-Fractionen wurde mittels SDS-PAGE (s. 4.4.1) und Autoradiographie überprüft. Erst ab einer Konzentration von 800 mM NaCl konnte pUL104 von der Säule eluiert werden (Abb. 5.15 A), was auf eine Bindung von pUL104 an DNA hindeutet. Dagegen ist bei MCP kein Signal zu erkennen (Abb. 5.15 B), was darauf schließen lässt, dass das Protein schon bei den Waschschritten vollständig entfernt wurde. Damit hat pUL104 die Fähigkeit sequenz-unspezifisch an doppelsträngige DNA zu binden.

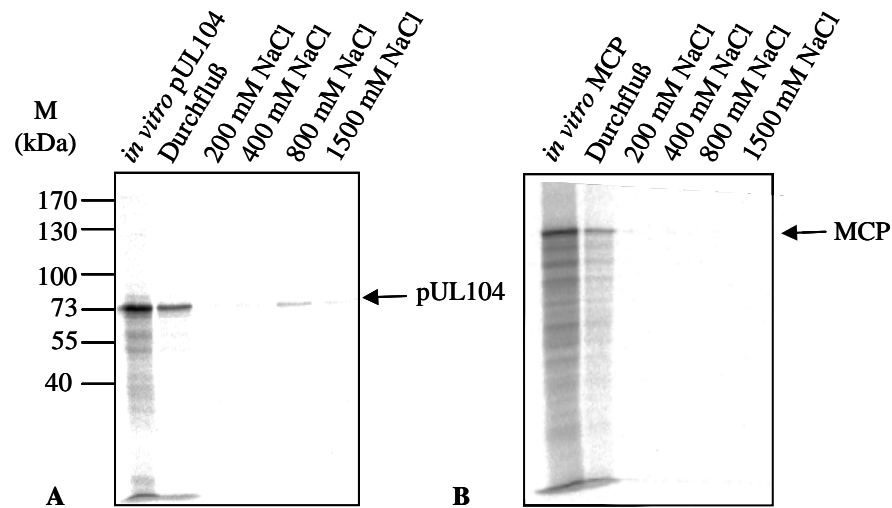


Abb. 5.15 *in vitro* Analyse der DNA-Bindung von pUL104. Eine Säule mit einer dsDNA-Matrix wurde mit *in vitro* translatiertem (A) pUL104 (*in vitro* pUL104) oder (B) MCP (*in vitro* MCP) beladen und gebundene Proteine nach Waschen über steigende Salzkonzentrationen (200, 400, 800, 1500 mM NaCl) eluiert. Die Analyse der Fraktionen erfolgte über SDS-PAGE (8%) und anschließende Autoradiographie.

5.7 Einfluss von Benzimidazol-D-Ribonukleosiden auf die DNA-Verpackung

Die Substanzklasse der Benzimidazol-D-Ribonukleoside beinhaltet verschiedene HCMV-Inhibitoren, u.a. BDCRB, die über unterschiedliche Mechanismen die DNA-Verpackung unterbinden. Um den möglichen Einfluss von BDCRB, das auch die ATPase-Aktivität der großen Terminase-Untereinheit pUL56 inhibiert, und Cl₄RB, dessen Wirkungsmechanismus bisher unbekannt ist, sowie der inaktiven Kontrollsubstanz CDMRB auf die pUL104-pUL56 Interaktion zu untersuchen, wurden infizierte Zellen mit BDCRB, Cl₄RB bzw. CDMRB behandelt und im Anschluß Co-Immunpräzipitationen durchgeführt. Der Einfluss von Cl₄RB auf infizierte Zellen wurde außerdem über EM-Aufnahmen analysiert. Eine Inhibition der DNA-Prozessierung durch Cl₄RB wurde mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) untersucht.

5.7.1 Inhibition der pUL104-pUL56 Interaktion durch Benzimidazol-D-Ribonukleoside

AD169-infizierte HFF in 75 cm² Flaschen (s. 4.1.4) in An- oder Abwesenheit von 100 µM CDMRB, BDCRB oder Cl₄RB und nicht-infizierte Zellen wurden 72 h p.i.

geerntet (s. 4.1.6) und jeweils vergleichbare Mengen an Zellextrakten in einer Co-Immunpräzipitation mit pAbUL56 eingesetzt (s. 4.3.5). Präzipitiertes pUL104 sowie pUL104 in den Ausgangslysaten wurde über SDS-PAGE (s. 4.4.1) und anschließend Immunoblot mit pAbUL104 nachgewiesen (s. 4.4.3). Als Ladungskontrolle wurde die Aktin-Menge in den verschiedenen Ansätzen über SDS-PAGE und Immunoblot mit einem Anti-Aktin-Antikörper abgeglichen (Abb. 5.16 C). Die Dimerform von pUL104 lässt sich in allen Zelllysate-Ansätzen abgesehen von der Kontrolle nachweisen (Abb. 5.16 A), wobei unter BDCRB-Einwirkung die pUL104 Menge leicht abnimmt. In den Co-Immunpräzipitationen ist in den unbehandelten Zellen sowie nach Zugabe von CDMRB und BDCRB eine Präzipitation von pUL104 mit pAbUL56 nachweisbar. In dem mit Cl₄RB behandelten Ansatz und nicht infizierten Zellen ist kein Protein detektierbar (Abb. 5.16 B).

Dieses Ergebnis zeigt, dass pUL104 und pUL56 auch *in vivo* interagieren, und dass diese Interaktion durch das Benzimidazol-D-Ribonukleosid Cl₄RB inhibiert werden kann.

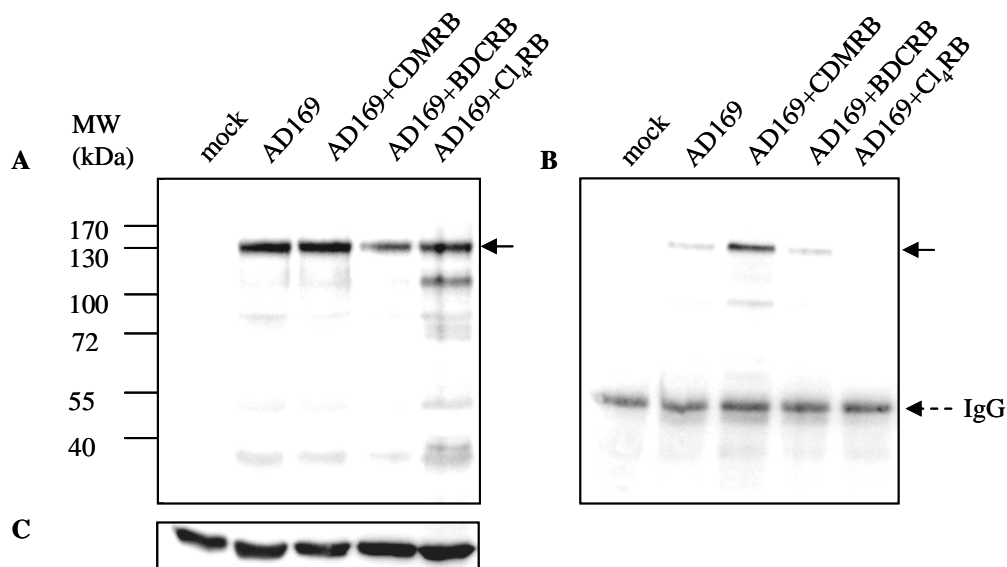


Abb. 5.16 Interaction von pUL104 mit der Terminase-Untereinheit pUL56 und Inhibition durch Benzimidazol-D-Ribonukleoside. HFF wurden nicht oder mit HCMV AD169 in An- oder Abwesenheit von 100 μ M CDMRB, BDCRB oder Cl₄RB infiziert. Die Zellextrakte wurden 72 h p.i. direkt verwendet (A) oder mit pAbUL56 immunpräzipitiert (B). Die Analyse der Ansätze erfolgte über SDS-PAGE (8%) und Immunoblot mit pAbUL104. Als Ladungskontrolle wurden gleiche Aliquots der Ansätze von (A) im Immunoblot mit einem Anti-Aktin-Antikörper angefärbt (C).

5.7.2 Analyse des Effekts von Cl_4RB auf in infizierte Zellen

AD169-infizierte HFF ($\text{MOI}=3$, s. 4.1.4) wurden in An- oder Abwesenheit von $100 \mu\text{M}$ Cl_4RB für 72 h inkubiert und dann eingebettet (s. 4.5.1). EM-Aufnahmen erfolgten mit einem Zeiss EM T109 Elektronenmikroskop.

In Anwesenheit von Cl_4RB ist die DNA-Verpackung blockiert und es werden nur B-Kapside gebildet (Abb. 5.17 B), während in infizierten Zellen ohne Inhibitor alle Kapsid-Formen beobachtet werden können (Abb. 5.17 A). Hier sind zu 5,9% A-, 51% B-, und 43% C-Kapside zu sehen, dagegen sind es in den behandelten Zellen über 90% B-Kapside (Tab. 5.2). Daraus lässt sich schließen, dass Cl_4RB die Ausbildung von replikationskompetenten Partikeln und damit die Ausbreitung der Infektion verhindert.

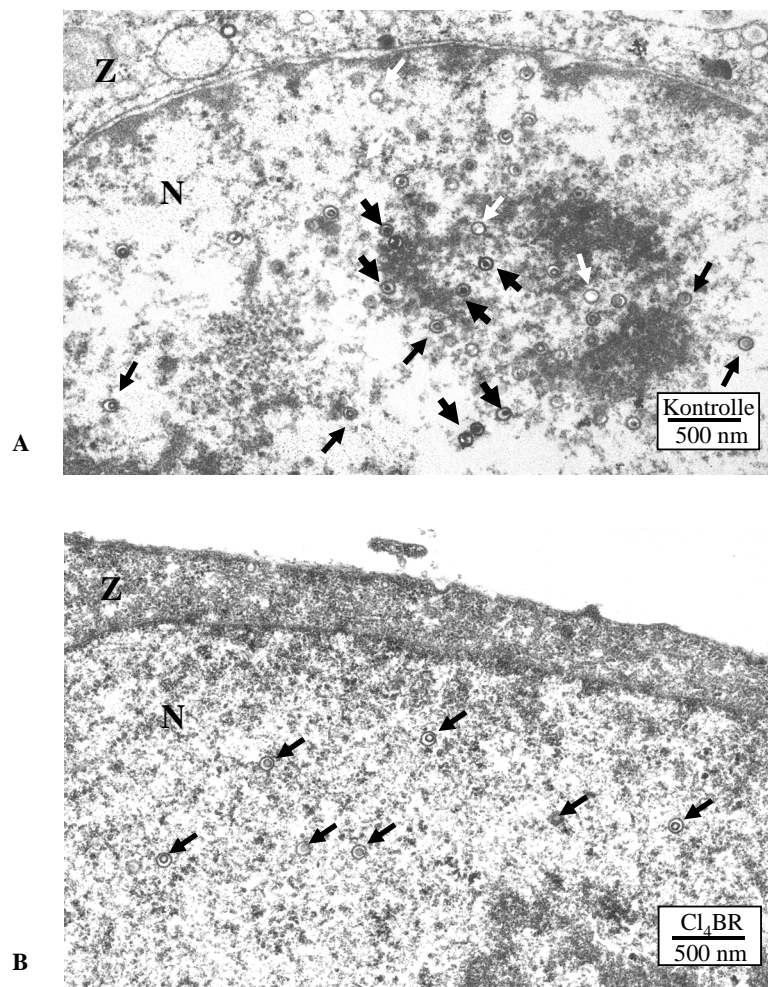


Abb. 5.17 Elektronenmikroskopische Analyse von Ultradünnschnitten HCMV infizierter Zellen in der An- (A) oder Abwesenheit von $100 \mu\text{M}$ Cl_4RB (B). Die Zellen wurden 72 h p.i. mit 4% (w/v) Paraformaldehyd, 2.5% (v/v) Glutaraldehyd und 1% (w/v) Tannin fixiert und eingebettet. B-Kapside sind mit schwarzen Pfeilen, A-Kapside mit weißen Pfeile und C-Kapside mit dicken Pfeilen dargestellt. N=Nukleus, Z=Zytoplasma.

Zellen	gezählte Kerne	A-Kapside (%)	B-Kapside (%)	C-Kapside (%)
AD169	10	4 (5,9)	34,5 (51)	29 (43)
AD169 + Cl ₄ RB	10	0,3 (2,4)	12,1 (97,6)	0 (0)

Tab. 5.2 Anzahl der Kapside pro Kern in infizierten Zellen in An- oder Abwesenheit von Cl₄RB

5.7.3 Analyse der DNA-Prozessierung bei Cl₄RB-Behandlung

Um festzustellen, ob Cl₄RB die Spaltung konkatermer viraler DNA in einzelne Genom-Einheiten inhibieren kann, wurde intrazelluläre virale DNA mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt (s. 4.2.12). AD169 infizierte HFF in 6 cm-Schalen (s. 4.1.4) wurden 72 h mit oder ohne 100 µM Cl₄RB inkubiert und anschließend lysiert. Je ein Aliquot wurde mit der Restriktionsendonuklease (RE) *NotI* verdaut, über Pulsfeld-Gelelektrophorese aufgetrennt und die DNA analysiert.

Während sich bei den unbehandelten Proben in beiden Fällen monomere Genomeinheiten zeigen (Abb. 5.18), entstehen diese bei den mit Cl₄RB behandelten Zellen erst nach Nuklease-Behandlung. Ansonsten sind nur Konkatemere sichtbar. Cl₄RB hat somit einen Einfluß auf die DNA-Prozessierung.

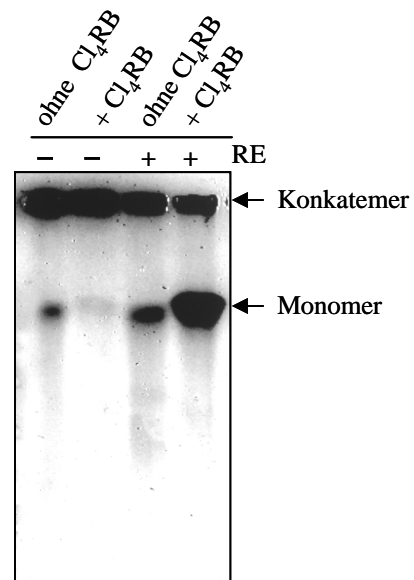


Abb. 5.18 PFGE-Analyse von DNA aus infizierten Zellen in An- oder Abwesenheit von Cl₄RB. Intrazelluläre DNA wurde 72 h p.i. über PFGE aufgetrennt und mit Ethidium-Bromid angefärbt. Je ein Aliquot wurde mit der Restriktionsendonuklease (RE) *NotI* inkubiert.

5.8 Inhibition der pUL104-Expression über RNA-Interferenz

Um den Effekt einer Inhibition der pUL104-Expression auf die HCMV-Replikation zu untersuchen, wurde diese durch die Degradation der UL104-mRNA über spezifische siRNAs reduziert. Die RNA-Interferenz (RNAi) beruht auf einem zellulären Mechanismus zum Abbau von dsRNA und wird induziert durch das Einbringen von dsRNA, die homolog zu der Zielsequenz ist. Diese wird in 21-23 nt Fragmente gespalten, die als *small interfering RNAs* (siRNAs), zusammen mit einem Nuklease-Komplex den *RNA induced silencing complex* (RISC) bilden. Dieser bindet homologe Transkripte über Basenpaarung und degradiert sie (Hammond et al., 2001; Sharp, 2001; Hutvagner and Zamore, 2002; Nykanen et al., 2001; Übersichtsartikel: Hammond, 2005).

Zur Untersuchung von RNAi-Effekten auf UL104 wurde das BD Knockout RNAi System (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet. Dazu wurden zwei Sequenzen ausgesucht, die HCMV UL104 spezifisch sind und sich laut Hersteller-Protokoll als siRNAs eignen; UL104 bp 503-522 (si1) und 1061-1080 (si2). Zur Expression als *short hairpin RNAs* (shRNAs) wurden die Sequenzen als Oligonukleotide synthetisiert und in den Vektor pSIREN-IRES-EGFP-RetroQ kloniert. Dieser Vektor enthält eine Verpackungssequenz, der die Aufnahme in Retroviren und die stabile Integration in genomische DNA ermöglicht, sowie eine Puromycin-Resistenz-Kassette zur Selektion in eukaryontischen Zellen, mit der weiterhin die Expression von GFP gekoppelt ist. Die Wirksamkeit der shRNAs wurde durch Co-Transfektion der pSIREN-Konstrukte mit pcDNA-UL104 in 293T-Zellen überprüft. Im Anschluß wurden über retrovirale Transduktion stabile HFF-Zelllinien geschaffen, die die entsprechenden shRNAs exprimieren. Nach Infektion der Zellen mit AD169 wurde die pUL104 Expression überprüft. Um die Inhibition der HCMV Replikation zu quantifizieren, wurden Plaque-Reduktions-Assays sowie Titer-Reduktions-Assays durchgeführt. Darüber hinaus fand zur Charakterisierung des Replikationsblocks eine EM-Analyse eingebetteter Zellen statt.

5.8.1 Klonierung von UL104-shRNAs in pSIREN-IRES-EGFP-RetroQ

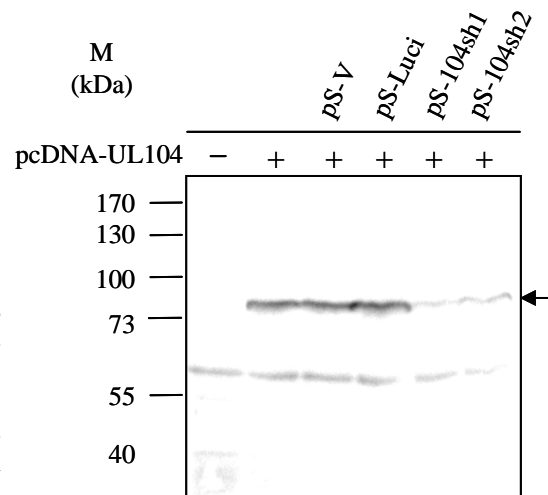
Die verwendeten shRNA-Oligonukleotide 104sh1-5', 104sh1-3', 104sh2-5' und 104sh2-3' wurden von der Firma biomers.net GmbH, Ulm, synthetisiert. Sie enthalten

neben den siRNA-Sequenzen auch einen *hairpin-loop* zur Doppelstrangbildung, eine Poly(T)-Sequenz zur Termination und eine *XhoI*-Schnittstelle zur Verifizierung der Insertion. Die jeweils komplementären Oligonukleotide wurden in einer PCR-Reaktion nach Herstellerangaben zusammengelagert (s. BD Knockout RNAi Systems User Manual). Im Anschluß wurden die PCR-Produkte und der Vektor pSIREN-IRES-EGFP-RetroQ mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI verdaut (s. 4.2.3) und der Vektor dephosphoryliert (s. 4.2.4). Nach Aufreinigung der DNA wurden Vektor und Insert ligiert (s. 4.2.7) und in *E.coli* XL1 blue Zellen transformiert (s. 4.2.9). Positive Klone wurden mit Ampicillin selektioniert, aus ihnen die Plasmid-DNA aufgereinigt (s. 4.2.1) und die Insertion der Oligonukleotide in pSIREN-104sh1 und pSIREN-104sh2 durch Kontrollreaktion mit *XhoI* überprüft.

5.8.2 Überprüfung der pUL104-Expression bei transienter shRNA Expression in 293T-Zellen

Um festzustellen, ob die ausgesuchten siRNAs einen Effekt auf die pUL104-Expression haben, wurden unter Verwendung von LipofectamineTM 2000 Co-Transfektionen in 293T-Zellen durchgeführt (s. 4.1.5). Dazu wurde pcDNA-UL104 singular oder mit folgenden pSIREN-IRES-EGFP-RetroQ-Konstrukten transfiziert: pS-V (Leervektor), pS-Luci (Luciferase-siRNA), pS-104sh1 und pS-104sh2. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion lysiert (s. 4.1.6), über SDS-PAGE aufgetrennt (s. 4.4.1) und im Immunoblot mit dem Anti-XpressTM-Antikörper analysiert (s. 4.3.3). Während die Expression von pUL104 einzeln oder in Verbindung mit dem pSIREN-Leervektor und der unspezifischen shRNA ein starkes Signal zeigt, ist dieses bei Zugabe einer der beiden UL104-spezifischen shRNAs deutlich reduziert. In den nicht mit UL104 transfizierten Zellen ist keine spezifische Bande zu erkennen (s. Abb. 5.19). Dieses Ergebnis zeigt, dass die durch die shRNAs 104sh1 und 104sh2 gebildeten siRNAs spezifisch die pUL104-Expression inhibieren. Der verwendete Vektor allein oder eine siRNA gegen eine in diesem System nicht vorhandene Sequenz haben dagegen keine Wirkung.

Abb. 5.19 Transiente Expression von pUL104 und shRNAs in 293T-Zellen. pcDNA-UL104 wurde einzelnen oder mit pS-V, pS-Luci, pS-104sh1 bzw. pS-104sh2 in 293T-Zellen co-transfiziert. Der Nachweis der pUL104 Expression erfolgte über SDS-PAGE (8%) und Immunoblot mit dem Anti-XpressTM-Antikörper.



5.8.3 Etablierung stabil shRNA-exprimierender HFF-Zelllinien über retrovirale Transduktion

Die Herstellung von retroviralen Partikeln (s. 4.1.10) erfolgte durch Co-Transfektion von pS-V, pS-Luci, pS-104sh1 bzw. pS-104sh2 mit den Verpackungsplasmiden pHIT60 und pVSV-G in 293T-Zellen. pHIT60 kodiert für die Gag- und Pol-Proteine des murinen Leukämievirus unter Kontrolle des CMV-Promotors, während pVSV-G das Hüllprotein G des Vesikulären-Stomatitis-Virus (VSV) exprimiert. Die Co-Expression dieser Proteine ermöglicht die Abgabe replikationsinkompetenter Retroviren in den Überstand der transfizierten Zellen. Dieser wurde 48 h nach Transfektion geerntet und auf HFF übertragen. Mit der Selektion auf transduzierte Zellen wurde 24 h p.i. durch Zugabe von 5 µg/ml Puromycin begonnen. Die erfolgreiche Transduktion konnte über die GFP-Expression nachgewiesen werden.

5.8.4 Überprüfung der pUL104-Expression nach HCMV-Infektion von shRNA-exprimierenden HFF

Für den Nachweis einer funktionalen Suppression der pUL104 Expression im viralen Kontext wurden die etablierten Zelllinien HFF-pS-V, -Luci, -104sh1 und -104sh2 in 75 cm² Flaschen mit AD169 infiziert (s. 4.1.4) und die Zellen 72, 96 und 120 h p.i. geerntet (s. 4.1.6). Jeweils vergleichbare Mengen an Zellextrakten wurden über SDS-PAGE (s. 4.4.1) aufgetrennt und die pUL104 Expression im anschließenden Immunoblot (s. 4.3.3) mit pAbUL104 nachgewiesen. Als Ladungskontrolle wurde die Aktin-Menge in den verschiedenen Ansätzen über SDS-PAGE und Immunoblot mit einem Anti-Aktin-Antikörper abgeglichen. Die pUL104 Expression wurde über das

Programm AIDA Image Analyzer quantitativ ermittelt und die prozentuale Menge im Vergleich zum pSIREN-Leervektor dargestellt, wobei die Aktin-Menge in den verwendeten Proben mit einberechnet wurde.

Die Dimerform von pUL104 ist in allen Ansätzen zu sehen, wobei sowohl für die pS-104sh1- als auch für die pS-104sh2-Zellen eine Abnahme der pUL104 Expression zu beobachten ist, die sich mit der Zeit verstärkt, während die der pS-V- und pS-Luci-Zellen relativ stabil bleibt (Abb. 5.20 A-C). 72 h p.i. (Abb. 5.20 A) zeigt sich eine Reduktion der pUL104 Expression von etwa 40% für beide shRNAs, bei 96 h p.i. (Abb. 5.20 B) etwa 60% für 104sh1 und 40% für 104sh2, bei 120 h p.i. (Abb. 5.20 B) etwa 80% für 104sh1 und 50% für 104sh2. Ein kompletter *knock-down* der pUL104 Expression lässt sich mit den verwendeten siRNAs nicht erreichen. Dennoch ist eine spezifische und deutliche Reduktion der pUL104 Expression zu beobachten.

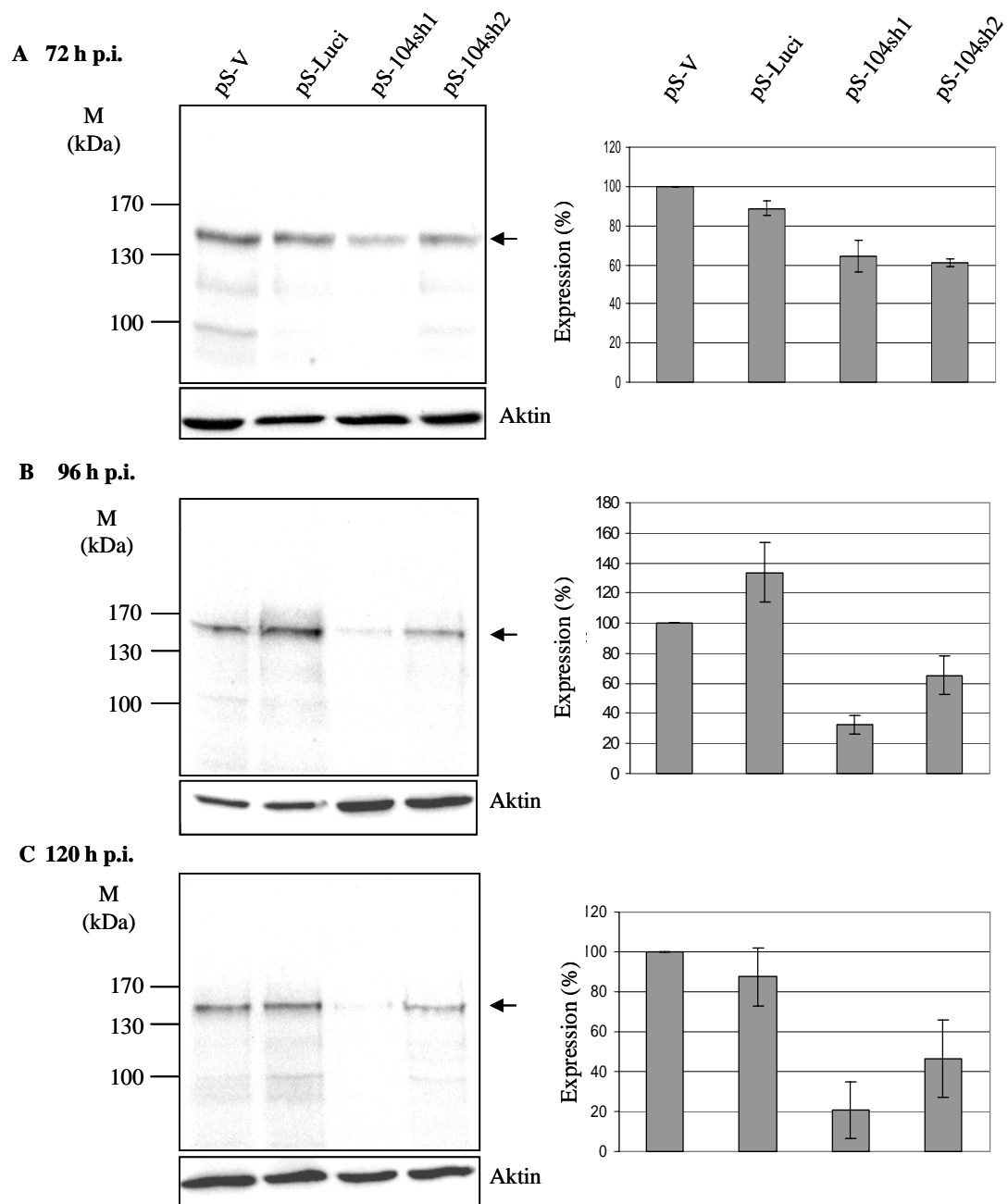


Abb. 5.20 Expression von pUL104 in shRNA-exprimierenden HFF. HFF-pS-V, -Luci, -104sh1 und -104sh2 wurden mit AD169 infiziert und 72 (A), 96 (B) und 120 h p.i. (C) geerntet. Die pUL104 Expression wurde mittels SDS-PAGE (8%) und anschließendem Immunoblot mit pAbUL104 aufgezeigt. Als Ladungskontrolle wurde die Aktin-Menge in den verschiedenen Ansätzen über SDS-PAGE (8%) und Immunoblot mit einem Anti-Aktin-Antikörper abgeglichen. Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem Programm AIDA und die pUL104 Expression wurde in Prozent bezogen auf den pS-V Wert dargestellt.

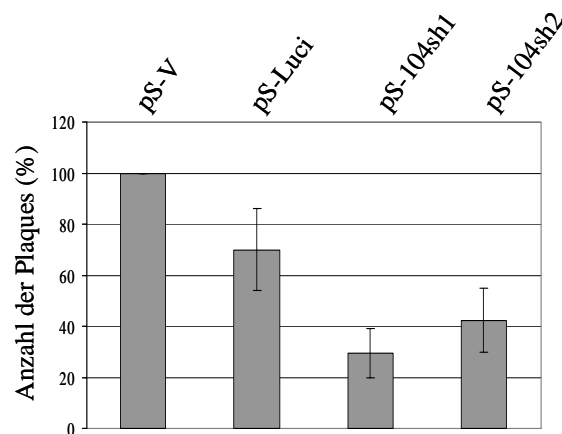
5.8.5 Analyse der viralen Replikationseffizienz in pUL104 reprimierten Zellen

Um den Einfluss der verminderten pUL104 Expression auf die HCMV Replikationseffizienz zu untersuchen, wurde nach Infektion von HFF-pS-V, HFF-pS-Luci, HFF-pS-104sh1 und HFF-pS-104sh2 in 24-wells mit AD169 (s. 4.1.4) Plaque-Assays durchgeführt. Die Zellen wurden nach Infektion mit 3 ml 0,6% Agarose 1:1 in

2xDMEM überschichtet und die Anzahl der entstandenen Plaques 10 d p.i. im Lichtmikroskop ausgezählt. Die Werte wurden prozentual bezogen auf die mit Leervektor transduzierten Zellen dargestellt und von 5 unabhängigen Experimenten Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Wie in Abbildung 5.21 zu sehen ist, zeigt sich bei Expression der unspezifischen Luciferase-shRNA eine Reduktion der Plaque-Bildung von ca. 30%, bei den UL104-spezifischen shRNAs dagegen eine Reduktion von ca. 70% bzw. 60% gegenüber der Vektor-Kontrolle. Auch im Vergleich mit den Luciferase-shRNA transduzierten Zellen läßt sich daher eine deutliche Reduktion der Plaque-Bildung durch die spezifischen shRNAs erkennen. Eine verminderte pUL104-Expression hat damit einen deutlichen Einfluß auf die Effizienz der HCMV-Replikation.

Abb. 5.21 Plaque-Assay mit shRNA-exprimierenden HFF. Nach Infektion von HFF-pS-V, -Luci, -104sh1 und -104sh2 mit AD169 bei einer MOI von 1 und Überschichtung mit Agarose wurden entstandene Plaques 10 d p.i. ausgezählt und prozentual bezogen auf die Vektor-Kontrolle dargestellt (n=5).



5.8.6 Analyse der Virusfreisetzung in pUL104 reprimierten Zellen

Zur Analyse der Freisetzung infektiöser Virionen aus Zellen mit verminderter pUL104-Expression wurden HFF-pS-V, HFF-pS-Luci, HFF-pS-104sh1 und HFF-pS-104sh2 in 6 wells mit AD169 infiziert (s. 4.1.4) und die Virustiter im Überstand 24, 48, 72, 96 und 120 h p.i. in einer Dreifach-Bestimmung ermittelt. Dazu wurde der Überstand auf nicht transduzierte HFF übertragen und der Titer über Endpunkt-Verdünnung und Auszählung der infizierten Zellen durch IE1-Anfärbung bestimmt (s. 4.1.3).

Die Virusfreisetzung aus den Zellen, die UL104-spezifische shRNAs exprimieren, ist zu allen beobachteten Zeitpunkten um mindestens 60% niedriger als die der HFF-pS-V oder HFF-pS-Luci, die sich etwa auf gleichem Level bewegen (s. Abb. 5.22 A+B). Auch bei diesem experimentellen Ansatz hat eine verminderte pUL104-Expression einen negativen Einfluß auf die HCMV-Replikation.

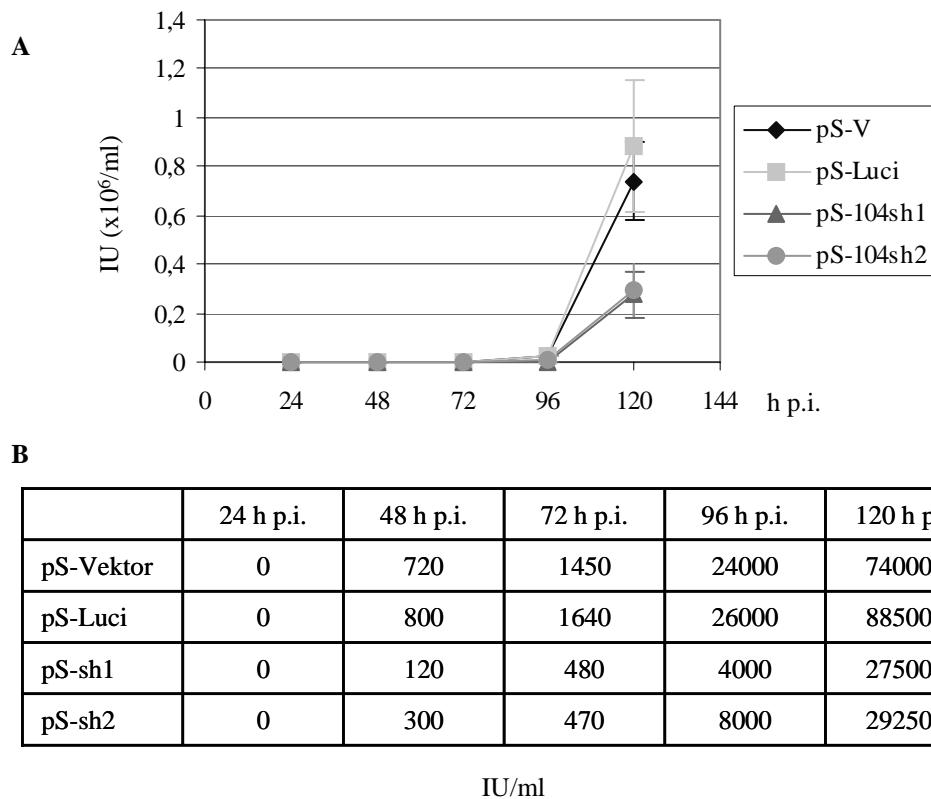


Abb. 5.22 Titerbestimmung nach Infektion shRNA-exprimierender HFF. Nach Infektion von HFF-pS-V, -Luci, -104sh1 und -104sh2 mit AD169 bei einer MOI von 1 wurde der Überstand nach 24, 48, 72, 96 und 120 h p.i. abgenommen und der Titer über Endpunkt-Verdünnung und Auszählung der infizierten Zellen durch IE-Anfärbung bestimmt (n=3). **(A)** Graphische Darstellung der infektiösen Einheiten (IU) gegen die Zeit mit Standardabweichung. **(B)** Auflistung der erhaltenen Mittelwerte.

5.8.7 EM-Analyse des Replikationsblocks in pUL104 reprimierten Zellen

Um den Einfluß UL104-spezifischer RNAi auf die Virusreifung und Verpackung zu untersuchen, wurden AD169-infizierte HFF-pS-Luci, HFF-pS-104sh1 und HFF-pS-104sh2 in 75 cm² Flaschen (MOI=3, s. 4.1.4) 96 h p.i. geerntet und dann eingebettet (s. 4.5.1). EM-Aufnahmen erfolgten mit einem Zeiss EM T109 Elektronenmikroskop bei einer konstanten Spannung von 80 kV.

Während in Luciferase-shRNA exprimierenden Zellen eine große Anzahl replikativer Strukturen wie Virionen und *dense bodies* (db) beobachtet werden kann, sind in den Zellen mit UL104-spezifischer siRNA fast nur Kapside und nicht-infektiöse Partikel (NIEPs) zu finden (Abb. 5.22). Die Inhibition der HCMV Replikation bei pUL104-Reprimierung läßt sich damit auf einen Block der DNA-Verpackung zurückführen.

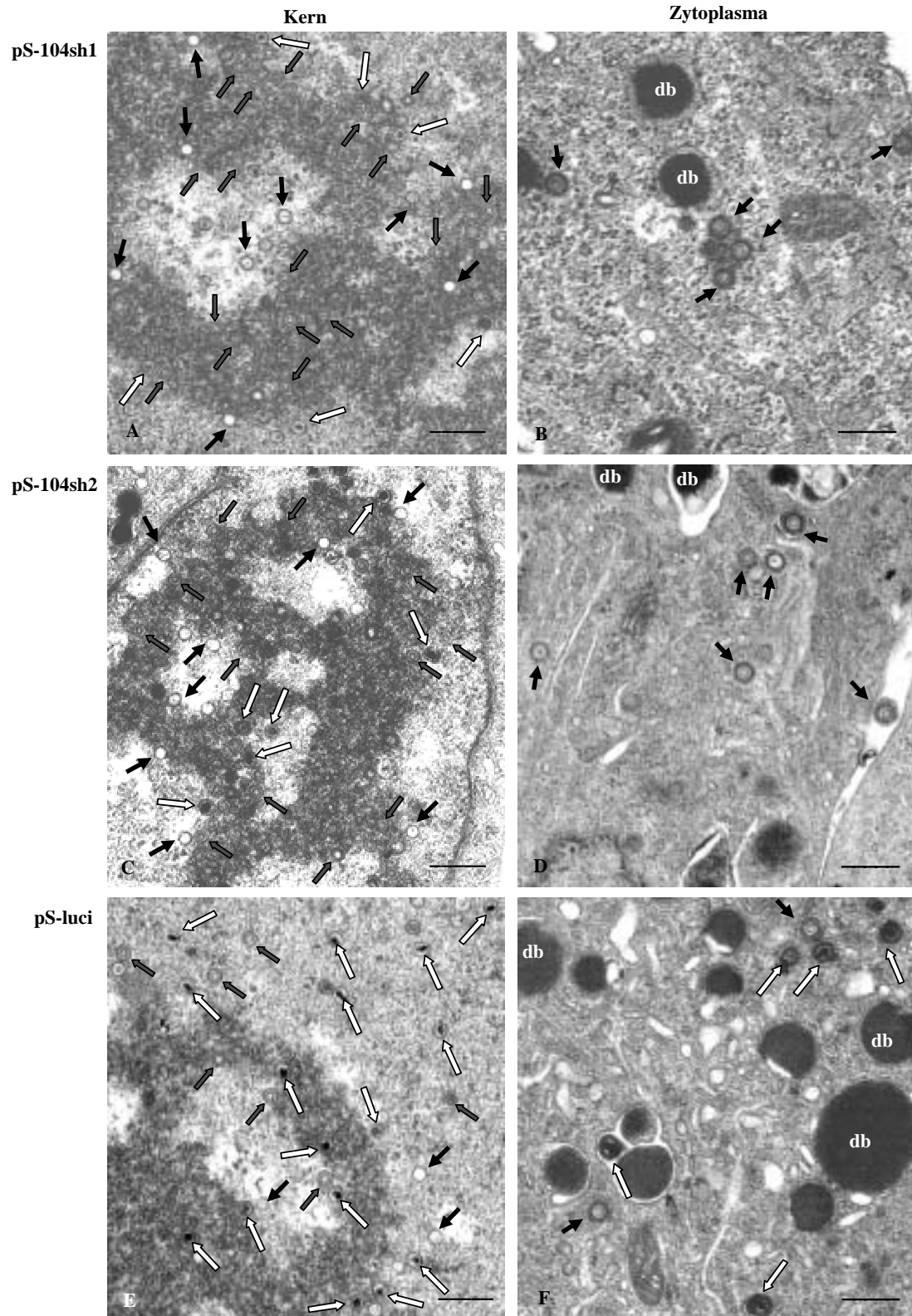


Abb. 5.23 Elektronenmikroskopische Analyse von Ultradünnschnitten pS-104sh1 (A, B), pS-104sh2 (C, D) oder pS-luci (E, F) transduzierter HFF. Die Zellen wurden 96 h p.i. mit 4% (w/v) Paraformaldehyd, 2,5% (v/v) Glutaraldehyd und 1% (w/v) Tannin fixiert und eingebettet. A, C und E zeigen Ausschnitte aus dem Zellkern, B, D und F aus dem Zytoplasma. B-Kapside sind durch graue Pfeile, A-Kapside durch schwarze Pfeile, C-Kapside durch weiße Pfeile dargestellt; NIEPs sind durch schwarze Pfeile, Virionen durch weiße Pfeile dargestellt. Das Größenmaß entspricht 50 nm.

6. Diskussion

Die DNA-Verpackung ist sowohl bei den Herpesviren als auch bei dsDNA Bakteriophagen ein komplexer Vorgang, der auf der reibungslosen Zusammenarbeit verschiedener viraler Komponenten beruht und für die Bildung infektiöser Tochter-Virionen essentiell ist.

Dazu gehört die Spaltung der konkatemeren DNA durch die virale Terminase, die Interaktion mit dem Portalprotein und Translokation der DNA in ein vorgefertigtes Pro-Kapsid (Black, 1988; Newcomb et al., 2001; White et al, 2003). Während der DNA-Verpackung erfolgt ein Reifungsprozeß, an dessen Ende ein ikosaedrisches, stabiles Kapsid steht (Gibson, 2001; Steven et al., 2005). Sowohl die HCMV Terminase als auch die Kapsid-Reifung sind schon ausführlich untersucht worden. Über das HCMV Portalprotein ist dagegen noch nichts bekannt. In dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass es sich bei pUL104 um das HCMV Portalprotein handelt. Dazu wurden Experimente zur subzellulären Verteilung und der Struktur von pUL104 vorgenommen. Weiterhin wurden Analysen zur Rolle von pUL104 in der DNA-Verpackung sowie als möglichen Ansatzpunkt für die antivirale Therapie durchgeführt.

6.1 Subzelluläre Verteilung von pUL104

Bei den Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von HCMV pUL104 nach solitärer Expression zeigte sich, daß das Protein unabhängig von anderen viralen Faktoren in den Kern importiert wurde und damit ein endogenes nukleäres Lokalisationssignal (NLS) besitzen muß (s. Abb. 5.1).

Der nukleäre Import von Makromolekülen wird durch Importine, hauptsächlich Importin α und β , vermittelt. Während die meisten Importine direkt mit dem Cargo-Protein über dessen NLS interagieren, geht Importin β auch einen Komplex mit Importin α ein. Dabei fungiert Importin α als Adapter, der hunderte klassischer NLSs binden kann. Die Interaktion mit dem *nuclear pore complex* (NPC) und die Translokation wird über Importin β vermittelt (Macara, 2001; Fried and Kutay, 2003; Goldfarb et al., 2004). Ein klassisches NLS besteht entweder aus einem einzelnen Abschnitt basischer Aminosäuren (monopartites NLS) oder aus zwei Abschnitten, die durch 10-12 Aminosäuren getrennt sind (bipartites NLS). Beispiel hierfür sind

die SV40 large-T Antigen (PKKKRKV) und Nukleoplasmin (KRPAATKKAGQAKKKK) Kernlokalisationssignale (Robbins et al., 1991; Dingwall and Lasky, 1991). Neben diesen klassischen Signalen sind noch viele weitere NLS-Sequenzen bekannt, so dass keine allgemeine Konsensussequenz vorhanden ist.

Eine Überprüfung der Aminosäuresequenz von pUL104 ergab keine Übereinstimmung mit bisher bekannten Kernlokalisations-Signalen. Daher wurden überlappende Deletionsmutanten von pUL104 hergestellt, um den Bereich des pUL104-NLS einzugrenzen. Alle überprüften pUL104-Varianten wiesen eine zytoplasmatische Lokalisation auf (s. Abb. 5.2). Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei dem pUL104-NLS um ein nicht lineares Epitop handelt. Dieses Epitop könnte für seine Exposition auf der Proteinoberfläche auf eine korrekte Faltung angewiesen sein, die durch die Deletionen in jedem Fall zerstört wird. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass es sich um eine sehr weitläufige Domäne handelt, wie z.B. das nukleäre Exportsignal (NES) des Snurportin, das den größten Teil des Proteins umfaßt (Paraskeva et al., 1999), oder um mehrere verteilte Domänen, wie es bei den nukleären Lokalisationssignalen von Uridin-reichen *small nuclear ribonucleoproteins* (U snRNPs) der Fall ist (Palacios et al., 1997).

Die homogene nukleäre Verteilung von pUL104 bei der singulären Expression steht im Gegensatz zur Verteilung des Proteins während der HCMV Infektion. Hierbei wird pUL104 sowohl in intranukleäre als auch in zytoplasmatische Strukturen umverteilt (s. Abb. 5.8 A). Die Analyse von Zellen, die mit Phosphonoessigsäure behandelt wurden, zeigte, dass diese Umverteilung von der viralen DNA-Replikation abhängig war (s. Abb. 5.8 B).

Die intranukleären Einschlüsse ließen sich durch Co-Immunfluoreszenz mit den Genprodukten des ORF UL112-113 als virale Replikationszentren identifizieren (s. Abb. 5.13 A). Die Genprodukte des ORF UL112/112 sind für die Ausbildung von Präreplikationszentren verantwortlich, die sich im Verlauf der Infektion zu Replikationszentren ausdehnen (Anders and McCue, 1996; Yamamoto et al., 1998). Die Replikationszentren wiederum sind für die Organisation der viralen DNA-Replikationsfaktoren und Kapsidproteine zuständig (Penfold and Mocarski, 1997). Zu frühen Zeitpunkten wird pUL104 zunächst an den äußeren Rand bereits bestehender Präreplikationszentren sowie später in die Replikationszentren rekrutiert,

was mit der angenommenen Funktion von pUL104 in der DNA-Verpackung übereinstimmt.

Da pUL104 weiterhin als Bestandteil von extrazellulären Virionen nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 5.6), ist anzunehmen, dass es bei der zytoplasmatischen Lokalisation in der späten Phase des Replikationszyklus als Strukturprotein knospender Virionen vorliegt. Dabei könnte die Akkumulation von pUL104 in Kernnähe mit dem zytoplasmatischen Kompartiment zur Vervollständigung des Teguments und Umhüllung der HCMV-Virionen übereinstimmen (Tooze et al., 1993; Sanchez et al., 2000), während es sich bei der punktuellen Verteilung vermutlich um bereits umhüllte Virionen handelt, die ausgeschleust werden.

6.2 Struktur von pUL104

Die Expression von pUL104 erfolgte als Protein von ca. 75 kDa, wobei sich in infizierten Zellen auch ein Dimer von 150 kDa nachweisen ließ (s. Abb. 5.4). Dabei war das Monomer verstärkt im Zellkern und das Dimer verstärkt im Zytoplasma zu finden (s. Abb. 5.5). Crosslinking-Analysen zeigten weiterhin einen Übergang vom Monomer über das Dimer zu weiteren Oligomerisierungsstufen (s. Abb. 5.11). Durch Sedimentationsanalysen über einen Sucrosegradienten (s. Abb. 5.9) sowie Gelpermeations-Chromatographie (s. Abb. 5.10) konnte beobachtet werden, dass pUL104 im nativen Zustand hochmolekulare Komplexe von mindestens 670 kDa bildet. Dies wurde über einen Vergleich mit Markerproteinen festgestellt, die durch ihre globuläre Struktur einen Stoke-Radius erhalten, der sie im Einklang mit ihrem Molekulargewicht sedimentieren lässt. Asymmetrische Moleküle wandern im Sucrosegradienten als anscheinend kleinere Moleküle, in der Gelpermeations-Chromatographie dagegen größer als es ihrem tatsächlichen Molekulargewicht entspricht (Sober, 1968). Da pUL104 in beiden Analysen größer als das verwendete Markerprotein Thyroglobulin (669 kDa) wanderte, handelt es sich vermutlich um einen eher globulären Komplex. Dies wurde auch durch die Einzelpartikelanalysen von rekombinant exprimiertem pUL104 bestätigt (s. Abb. 5.12). Die beobachteten Proteine hatten einen Durchmesser von 17,7 nm in der Höhe und 17,5 nm in der Breite. Es ließen sich ringförmige Aufsichten, die auf einen zentralen Kanal hindeuten, sowie leicht U- oder tonnenförmige Seitenansichten ausmachen.

Die bisher bekannten Portalproteine bei Bakteriophagen und HSV-1 weisen deutliche Unterschiede in der Größe der Monomere auf, von 35,9 kDa (Bakteriophage Phi29; Guasch et al., 2002) bis 82,7 kDa (Bakteriophage p22; Bazinet et al., 1988). Diese werden jedoch alle zu strukturell ähnlichen Komplexen mit 12fach Symmetrie assembliert, wobei *in vitro* kleine Subpopulationen von Komplexen mit 11-14 Monomeren zu beobachten sind (Donate et al., 1988; Muller et al., 1997; Lurz et al., 2001; Trus et al., 2004; Agirrezabala et al., 2005). Von einer Reihe von Portalproteinen sind inzwischen hoch aufgelöste Strukturdaten vorhanden. So konnte die Röntgenstruktur des Portalproteins von Bakteriophage Φ 29 mit einer Auflösung von 3.2 Å dargestellt werden (Simpson et al., 2000). Die einzelnen Monomere sind entlang eines Kanals angeordnet, wobei sich ein weiter, oberer Teil (*crown*), der innerhalb des Kapsids liegt, ein durch α -Helices bestimmter Mittelteil mit 12 Seitenflügeln (*wings*) sowie ein enger, unterer Teil, der hauptsächlich aus β -Faltblättern besteht (*stem*), unterscheiden lassen. Diese Struktur lässt sich in ihren Grundzügen bei allen Portalproteinen finden, wobei es Variationen in der Höhe (75-144 Å) und in der Ausprägung der Seitenflügel (146-205 Å) gibt, während die Struktur um den zentralen Kanal starke Übereinstimmungen zeigt (Jiang et al., 2006; Orlova et al., 2003; Agirrezabala et al., 2005; Trus et al., 2004).

Auch das HSV-1 Portalprotein pUL6 konnte durch Einzelpartikel-Analysen mit einer Auflösung von 16 Å dargestellt werden und weist die typische Architektur eines Portalproteins auf. Weiterhin zeigte ein Sequenzvergleich mit anderen Herpesviren eine starke Konservierung dieses Gens innerhalb der Familie der Herpesviridae (Trus et al., 2004; NCBI *conserved domain database* pfam01763; Marchler-Bauer et al., 2005).

Von pUL104 konnte bisher keine hochaufgelöste Strukturanalyse erstellt werden, aber die erhaltenen Daten zeigen, dass es sich mindestens um ein Nonamer handeln muß. Da die Komplexbildung auf Dimerbausteinen zu beruhen scheint, ist ein Oligomer mit einer geraden Monomeranzahl wahrscheinlicher. Auch aufgrund der Primärstruktur-Übereinstimmung mit HSV-1 pUL6 (s. 9.3) und der leichten 6-fach Symmetrie der Einzelpartikel ist ein Dodecamer für pUL104 zumindest nicht auszuschließen.

6.3 Rolle von pUL104 in der DNA-Verpackung

Da Portalproteine für die Einschleusung der viralen DNA in Kapside verantwortlich sind, ist zur Ausübung dieser Funktion neben der spezifischen Architektur die Lokalisation an einer der Ikosaeder-Ecken, einem Kapsidvertex, die Fähigkeit zur Interaktion mit dsDNA, sowie die Bindung an die virale Terminase notwendig.

Durch EM-Analyse von Ultradünnschnitten infizierter Fibroblasten nach Immunogold-Färbung konnte pUL104 einzeln an Kapsiden nachgewiesen werden (s. Abb. 5.7). Die geringe Anzahl der mit pAbUL104 markierten Kapside lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass pUL104 nur an einem einzelnen Kapsidvertex zu finden ist und die Kapsidunterseite für die Antikörper-Bindung nicht zugänglich ist. Auch bei Immunogoldfärbungen von HSV-1 und Bakteriophage PRD1-Kapsiden konnte nur ein geringes Niveau an Portalproteinen markiert werden (Thurlow et al., 2006; Gowen et al., 2003). Da Portalproteine nur an einem einzelnen Vertex vorliegen, muss der Einbau kontrolliert vorgenommen werden. Für einige Bakteriophagen wie z.B. Bakteriophage λ wird eine Funktion des Portalproteins für die Initiierung des Kapsid-Zusammenbau vermutet (Kochan et al., 1984). Bei den Bakteriophagen Φ 29 und P22 sowie bei HSV-1 dagegen werden vollständige Kapside auch in der Abwesenheit eines Portalproteins gebildet (Guo et al., 1991; Prevelige et al., 1993; Newcomb et al., 1996; Patel et al., 1996). Da bei einer RNAi-vermittelten Inhibierung der pUL104 Expression weiterhin eine vergleichbare Anzahl an Kapsiden bezogen auf ein wildtypisches pUL104-Niveau gebildet wird (s. Abb 5.23), ist anzunehmen, dass dies auch für die HCMV-Kapsidbildung gilt. Da für HCMV kein *in vitro* System für die Zusammensetzung der Kapside zur Verfügung steht, bietet die RNAi eine Möglichkeit die Rolle einzelner Komponenten in diesem Prozess zu untersuchen.

Zur Translokation der DNA in das Kapsid ist eine transiente, sequenz-unspezifische Bindung des Portalproteins an das virale Genom notwendig. In einem *in vitro* DNA-Bindungsexperiment konnte gezeigt werden, dass pUL104 in der Lage ist, an dsDNA-Zellulose vorübergehend zu binden (s. Abb. 5.15). Diese funktionelle Anforderung an ein Portalprotein wird somit von pUL104 erfüllt. Die Spezifität der DNA-Interaktion wird über die HCMV Terminase sichergestellt, die an Verpackungssequenzen im viralen Genom bindet (Bogner et al., 1998; Scheffczik et al., 2002).

Um eine Interaktion von pUL104 mit der HCMV Terminase aufzuweisen, erfolgten *in vitro* Bindungsexperimente (s. Abb. 5.14), durch die eine Bindung von pUL104 mit der C-terminalen Hälfte der großen Terminase-Untereinheit pUL56 nachgewiesen werden konnte, nicht aber mit der kleinen Terminase-Untereinheit pUL89. Eine Interaktion beider Proteine *in vivo* konnte weiterhin durch Co-Immunpräzipitationen (s. Abb. 5.16) gezeigt werden. Auch in der Immunfluoreszenz co-lokalisieren pUL104 und pUL56 während des gesamten Infektionszyklus (s. Abb. 5.13). Dies deutet auf eine enge Assoziation beider Protein hin. Dieses Ergebnis lässt die Schlußfolgerung zu, dass die pUL104-pUL56 Bindung für die bereits beschriebene Assoziation von pUL56 mit dem HCMV Kapsid (Scheffczik et al., 2002) verantwortlich ist.

Auch bei HSV-1 konnte eine Bindung zwischen dem Portalprotein pUL6 und der HSV-1 Terminase, bestehend aus pUL15 und pUL28 (Addison et al., 1990; Baines et al., 1994; Adelman et al., 2001), nachgewiesen werden, wobei pUL6 allerdings sowohl mit pUL15 als auch mit pUL28 interagiert (White et al., 2003). Weiterhin zeigt die HSV-1 Terminase nur eine transiente Assoziation mit den reifenden Kapsiden (Sheaffer et al., 2001), während bei HCMV die große Terminase-Untereinheit pUL56 als struktureller Bestandteil am Kapsid verbleibt (Bogner et al., 1993). Damit zeigen sich trotz Verwendung des gleichen Mechanismus für die DNA-Verpackung und der starken Homologie zwischen HCMV pUL104 und HSV-1 pUL6 durchaus Unterschiede in den Details.

6.4 pUL104 als Ansatzpunkt für die antivirale Therapie

Für die Behandlung und Prevention von HCMV Infektionen werden die Nukleosid Analoga Ganciclovir (Crumpacker, 1996), Valganciclovir (Curran and Noble, 2001) und Cidofovir (Hitchcock et al, 1996), sowie das Pyrophosphat Analog Foscarnet (PFA; Chrisp and Clissold, 1991) verwendet. Bei diesen Medikamenten werden allerdings Probleme durch ihre Toxizität (Curran and Noble, 2001; Deray et al., 1989) sowie durch die Entstehung von zum Teil kreuzresistenten Virusmutanten (Lurain et al., 1994; Erice, 1999) verursacht. Daher besteht ein Bedarf an neuen antiviralen Wirkstoffen, die weniger toxisch sind und denen andere Mechanismen zugrunde liegen. Die DNA-Verpackung bietet einen guten Ansatzpunkt, da es keine

zellulären Äquivalente für die virale Terminase oder das Portalprotein gibt, die von einem Wirkstoff mitbetroffen wären.

Bereits bekannt ist die Substanzklasse der Benzimidazol-D-Ribonukleoside, die verschiedene HCMV-Inhibitoren beinhaltet. Die Wirksamkeit der Benzimidazol-D-Ribonukleoside TCRB und BDCRB, die Inhibitoren der HCMV Replikation sind, läßt sich auf Inhibition der HCMV Terminase-Aktivität zurückführen (Krosky et al., 1998; Bogner, 2002; Scholz et al., 2003; Savva et al., 2004). Für beide Substanzen konnte gezeigt werden, daß bei TCRB und BDCRB resistenten Virusmutanten, die Mutationen in UL56 und UL89 aufweisen, auch eine Mutation in UL104 auftritt, die möglicherweise einen kompensatorischen Effekt hat (Komazin et al., 2004). Da beide Substanzen für die klinische Nutzung eine zu geringe metabolische Stabilität aufweisen (Chulay et al., 1999; Good et al., 1994; Drach et al., 2006), wurden, um stabilere Moleküle zu erhalten, weitere BDCRB-Derivate synthetisiert.

Für eine dieser Substanzen, Cl₄RB, konnte eine Inhibition der HCMV Replikation mit einer IC₅₀ von 0,061 µM nachgewiesen werden (Drach et al., 2006; Hwang et al., eingereicht). In Immunpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass Cl₄RB die Interaktion zwischen pUL56 und pUL104 inhibiert (s. Abb. 5.16). Weiterhin konnte durch EM-Analysen von Ultradünnschnitten HCMV infizierter Zellen unter Cl₄RB-Behandlung gezeigt werden, dass Cl₄RB die Ausbildung von replikationskompetenten Partikeln unterdrückt (s. Abb. 5.17). Da Cl₄RB auch die HCMV DNA-Prozessierung beeinflusst (s. Abb. 5.18), ist anzunehmen, dass pUL56 den Hauptangriffspunkt für Cl₄RB darstellt und die Bindung an pUL104 durch Blockade der Bindungsstelle oder allosterische Interferenz beeinträchtigt wird.

Für einen spezifischer HSV-1 Inhibitor, das Thio-Urea Präparat WAY-150138, konnte das HSV-1 Portalprotein pUL6 als Zielstruktur identifiziert werden (van Zeijl et al., 2000). Diese Substanz verhindert die Inkorporation von pUL6 in entstehende Kapside und inhibiert so ebenfalls die DNA-Verpackung (Newcomb and Brown, 2002). Auch das Portalprotein ist damit ein wirksamer Ansatzpunkt für Inhibitoren. HCMV wird durch WAY-150138 nicht beeinflusst, was einen weiteren Unterschied zwischen den Portalproteinen beider Viren aufweist.

Als eine weitere Strategie zur spezifischen Reprimierung von Genprodukten hat sich die RNA-Interferenz erwiesen, die zu einer Degradation der Ziel-mRNA führt (Hammond, 2005). Die Expression von spezifischen siRNAs gegen UL104 führte zu einer deutlichen Reduktion sowohl des pUL104 Niveaus in infizierten Zellen (s.

Abb. 5.20) als auch zu einer verminderten HCMV-Replikation (s. Abb. 5.21 und 5.22). Durch EM-Analysen von Ultra-Dünnschnitten infizierter Fibroblasten, die mit den shRNAs transduziert waren, konnte gezeigt werden, dass die Inhibition auf einem Block der DNA-Verpackung beruhte und zu einer Akkumulation leerer B-Kapside und nicht replikationskompetenter Partikeln führte (s. Abb. 5.23). Dies ist ein weiterer Hinweis, dass es sich bei pUL104 um das HCMV Portalprotein handelt, und zeigt, dass pUL104 für die DNA-Verpackung notwendig ist.

Eine Reihe von Ansätzen zur Nutzung von RNAi als anti-virale oder anti-karzinogene Therapie sind zur Zeit in der Entwicklung (Wu and Chan, 2006; Guo et al., 2006; Godfrey et al., 2005; Li et al., 2005; Marukami et al., 2005). Auch HCMV lässt sich gut durch spezifische siRNAs inhibieren und besitzt keine Mechanismen, um RNAi zu umgehen (Wiebusch et al., 2004). Zum Einbringen der Effektor-Moleküle in die Zellen lassen sich lentivirale Vektoren gut verwenden, da sie sowohl proliferierende als auch ruhende Zellen stabil transduzieren können (Morris and Rossi, 2006). Der verwendete Ansatz zur Inhibition der pUL104 Expression ließe sich damit auch als anti-virale Strategie für HCMV verwenden. Durch Auswahl weiterer UL104 spezifischer siRNA-Sequenzen könnte die Effizienz der HCMV Inhibition möglicherweise noch weiter verbessert werden.

7. Zusammenfassung

Die HCMV DNA-Verpackung beruht auf der Spaltung konkatemerer DNA durch die virale Terminase, deren Interaktion mit einem im Kapsid vorliegenden Portalprotein und der anschließenden Translokation der DNA in das Kapsid. In der vorliegenden Arbeit konnte pUL104 als das HCMV Portalprotein identifiziert werden.

Über indirekte Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass pUL104 über ein nicht lineares, endogenes NLS verfügt und bei solitärer Expression im Zellkern vorliegt. In infizierten Zellen wird pUL104 in die Replikationszentren rekrutiert und erscheint spät nach Infektion als Bestandteil der Virionen im Zytoplasma. Nach Aufreinigung eines monospezifischen polyklonalen Antikörpers konnte pUL104 in infizierten Zellen durch Immunpräzipitationen als Protein von 75 kDa identifiziert werden, das auch als Dimer von 150 kDa vorliegt. Unter nativen Bedingungen liegen beide Formen als Komplex vor. Bei einer Zellfraktionierung zeigte sich ebenfalls eine sowohl nukleäre als auch zytoplasmatische Verteilung. Weiterhin konnte pUL104 als Strukturprotein in extrazellulären Virionen nachgewiesen werden. Dies konnte durch Immunogoldfärbung von Ultradünnschnitten infizierter Zellen weiter eingegrenzt werden, wo sich pUL104 einzeln an Kapsiden beobachten ließ.

Untersuchungen zur Struktur von pUL104 zeigten, dass rekombinant exprimiertes rpUL104 sowohl in der Sedimentation über einen Sucrosegradienten als auch in der Gelpermeationschromatographie als hochmolekularer Komplex von mindestens 670 kDa vorliegt. Auch bei Cross-Linking- und Einzelpartikel-Analysen liegt rpUL104 als Oligomer vor, wobei bei letzterem eine Ringstruktur mit einer tonnenförmigen Seitenansicht auszumachen war. Eine Interaktion mit pUL56, der großen Terminase-Untereinheit, ließ sich sowohl durch *in vitro* Bindungsexperimente als auch durch Co-Immunpräzipitationen *in vivo* nachweisen. Diese konnte durch den HCMV Inhibitor Cl₄RB, ein Benzimidazol-D-Ribonukleosid, unterbunden werden. Weiterhin konnte eine Bindung an dsDNA gezeigt werden. Sowohl die strukturellen als auch die funktionalen Anforderungen an ein Portalprotein werden damit durch pUL104 erfüllt.

Durch den Einsatz von UL104 spezifischer RNAi konnte eine Verminderung der pUL104 Expression und auch der HCMV Replikation erreicht werden. Die EM-Analyse von Ultradünnschnitten infizierter Zellen zeigte hierbei eine Akkumulation

leerer Kapside im Zellkern sowie einen Mangel an infektiösen Virionen im Zytoplasma. Dies zeigt, dass pUL104 für die DNA-Verpackung notwendig ist.

Zusammenfassend handelt es sich bei pUL104 um ein Kapsid-assoziiertes Oligomer, das mit der HCMV Terminase interagiert und für die DNA-Verpackung essentiell ist.

8. Literaturverzeichnis

- Adelman K, Salmon B, and Baines JD. 2001.** Herpes simplex virus DNA packaging sequences adopt novel structures that are specifically recognized by a component of the cleavage and packaging machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 3086-3091.
- Addison C, Rixon FJ, Preston VG. 1990.** Herpes simplex virus type-1 UL28 gene product is important for the formation of mature capsids. *J. Gen. Virol.* 71: 2377-2384.
- Agirrezabala X, Martin-Benito J, Valle M, Gonzalez JM, Valencia A, Valpuesta JM, Carrascosa JL. 2005.** Structure of the connector of bacteriophage T7 at 8Å resolution: structural homologies of a basic component of a DNA translocating machinery. *J Mol Biol.* 347: 895-902.
- Alford CA, Britt WJ. 1990.** Cytomegalovirus. in: Fields, B.N.; Knipe, D.M. et al. (eds.): *Virology*. Vol.2, 2nd Edition, Raven Press, N.Y., Chapter 70.
- Anders DG, McCue LA. 1996.** The human cytomegalovirus genes and proteins required for DNA synthesis. *Intervirology* 39: 378-388.
- Andreoni M, Faircloth M, Vulger L, Britt WJ. 1989.** A rapid microneutralization assay for the measurement of neutralizing antibody reactive with human cytomegalovirus. *J. Virol. Methods* 23: 157-167.
- Baines JD, Poon APW, Rovnak J, Roizman B. 1994.** The herpes simplex virus 1 UL15 gene encodes two proteins and is required for cleavage of genomic viral DNA. *J. Virol.* 68: 8118-8124.
- Baker ML, Jiang W, Rixon FJ, Chiu W. 2005.** Common ancestry of herpesviruses and tailed DNA bacteriophages. *J Virol.* 79: 14967-14970.
- Balfour HH Jr. 1979.** Cytomegalovirus: the troll of transplantation. *Arch. Int. Med.* 139: 280.
- Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Chee MS, Hutchison CA 3rd, Kouzarides T, Martignetti JA, Preddie E. 1991.** The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome. *DNA Seq.* 2: 1-12. Review.
- Baxter MK, Gibson G. 2001.** Cytomegalovirus basic phosphoprotein (pUL32) binds to capsids in vitro through its amino one-third. *J. Virol.* 75: 6865-6873.
- Bazinet C, Benbasat J, King J, Carazo JM, Carrascosa JL. 1988.** Purification and organization of the gene 1 portal protein required for phage P22 DNA packaging. *Biochemistry* 27: 1849-1856.
- Bello C, Whittle H. 1991.** Cytomegalovirus infection in gambian mothers and their babies. *J Clin Pathol.* 44: 366-369.

- Biron KK. 2006.** Maribavir: A promising new antiviral therapeutic agent. in: Bogner E. and Holzenburg A. (eds.): *New Concepts of Antiviral Therapy*; Springer, Dodrecht: 309-335.
- Biron KK, Harvey RJ, Chamberlain SC, Good SS, Smith AA 3rd, Davis MG, Talarico CL, Miller WH, Ferris R, Dornsife RE, Stanat SC, Drach JC, Townsend LB, Kozalka GW. 2002.** Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 2365-2372.
- Black LW. 1998.** DNA packaging in dsDNA bacteriophages. *Annu. Rev. Microbiol.* 43: 267-292.
- Britt WJ. 1984.** Neutralizing antibodies detect a disulfide-linked glycoprotein complex within the envelope of human cytomegalovirus. *Virology* 135: 369-378.
- Britt WJ, Auger D. 1985.** Identification of a 65 000 dalton virion envelope protein of human cytomegalovirus. *Virus Res.* 4: 31-36.
- Britt WJ, Pass RF, Stagno S, Alford CA. 1991.** Pediatric Cytomegalovirus infection. *Transplant Proc.* 23 Suppl. 3: 115-117.
- Browne EP, Shenk T. 2003.** Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11439-11444.
- Bogner E. 2002.** Human cytomegalovirus terminase as a target for antiviral chemotherapy. *Rev Med Virol.* 12: 115-127. Review.
- Bogner E, Reschke M, Reis B, Reis E, Britt W, Radsak K. 1992.** Recognition of compartmentalized intracellular analogs of glycoprotein H of human cytomegalovirus. *Arch Virol.* 126: 67-80.
- Bogner E, Reschke M, Reis B, Mockenhaupt T, Radsak, K. 1993.** Identification of the gene product encoded by ORF UL56 of the human cytomegalovirus genome. *Virology* 196: 290-293.
- Bogner E, Radsak K, Stinski MF. 1998.** The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J. Virol.* 72: 2259-2264.
- Bold S, Ohlin M, Garten W, Radsak K. 1996.** Structural domains involved in human cytomegalovirus glycoprotein B- mediated cell-cell fusion. *J Gen Virol.* 77: 2297-2302.
- Boyle KA, Compton T. 1998.** Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J. Virol.* 72: 1826-1833.

- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM. 1987.** XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376-378.
- Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. 1993.** Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8033-8037.
- Catalano CE, Cue D Feiss M. 1995.** Virus DNA packaging: the strategy used by phage lambda. *Mol. Microbiol.* 16: 1075–1086.
- Cha TA, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES, Spaete RR. 1996.** Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol.* 70: 78-83.
- Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. 1994.** Identification of herpesvirus-like DNA sequence in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266: 1865-1869.
- Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Hornsnell T, Hutchinson I, Kouzarides T, Martignetti J, Preddie E, Satchwell S, Tomlison P, Weston K, Barrell B. 1990.** Analysis of the protein-coding content of the sequence of Human Cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol.* 154: 125-169.
- Cheung TW, Teich SA. 1999.** Cytomegalovirus infection in patients with HIV infection. *Mt Sinai J Med.* 66: 113-124. Review.
- Child SJ, Hakki M, De Niro KL, Geballe AP. 2004.** Evasion of cellular antiviral responses by human cytomegalovirus *TRSL* and *IRSL*. *J. Virol.* 78: 197-205.
- Chulay J, Biron K, Wang L, Underwood M, Chamberlain S, Frick L, Good S, Davis M, Harvey R, Townsend L, Drach J, Koszalka G. 1999.** Development of novel benzimidazole riboside compounds for treatment of cytomegalovirus disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 458: 129-134.
- Cohen JI, Corey GR. 1985.** Cytomegalovirus infection in the normal host. *Medicine (Baltimore)* 64: 100-114.
- Cokol M, Nair R, Rost B. 2000.** Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep.* 1: 411-415.
- Compton T, Nowlin DM, Cooper NR. 1993.** Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 193: 834-841.
- Chrisp P, Clissold SP. 1991.** Foscarnet: a review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties, and the therapeutic use in immunocompromised patients with cytomegalovirus retinitis. *Drugs* 41: 104-129.

- Crumpacker CS. 1996.** Ganciclovir. Drug Ther. 335: 721-729.
- Curran M, Noble S. 2001.** Valganciclovir. Drugs 61: 1145-1150.
- de Bruyn Kops A, Knipe DM. 1994.** Preexisting nuclear architecture defines the intranuclear location of herpesvirus DNA replication structures. J Virol. 68: 3512-3526.
- de Bruyn Kops A., Uprichard SL, Chen M, Knipe DM. 1998.** Comparison of the intranuclear distributions of herpes simplex virus proteins involved in various viral functions. Virology 252: 162-178.
- Demmler GJ. 1991.** Infectious diseases society of america and centers disease control. Summary of a surveillance for congenital cytomegalovirus disease. Rev Infect Dis. 13: 315-329.
- Deray GF, Martinez F, Katlama C, Levatlier B, Beaufiles H, Danis M, Rosenheim M, Baumelou M, Dohin M, Gentilini M, Jocabos C. 1989.** Foscarnet nephrotoxicity: mechanism, incidence and prevention. Am. J. Nephrol. 9: 316-320.
- Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Diefenbach E, Holland DJ, Boadle RA, Armati PJ, Cunningham AL. 2002.** Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain. J. Virol. 76: 3282-3291.
- Dingwall C, Laskey RA. 1991.** Nuclear targeting sequences – a consensus? Trends Biochem. Sci. 16: 478–481.
- Dohner, K, Wolfstein A, Prank U, Echeverri C, Dujardin D, Vallee R, Sodeik B. 2002.** Function of Dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. Mol. Biol. Cell 13: 2795-2809.
- Donate LE, Herranz L, Scilla JP, Carazo JM, Fujisawa H, Carrascosa JL. 1988.** Bacteriophage T3 connector: three-dimensional structure and comparison with other viral head-tail connecting regions. J. Mol. Biol. 201: 91-100.
- Drach JC, Townsend LB, Bogner E. 2006.** Benzimidazole-D-Ribonucleoside as antiviral agents that target HCMV terminase. in: Bogner E. and Holzenburg A. (eds.): New Concepts of Antiviral Therapy; Springer, Dodrecht: 337-349.
- Dutch RE, Bruckner RC, Mocarski ES, Lehman IR. 1992.** Herpes simplex virus type 1 recombination: role of DNA replication and viral a sequences. J Virol. 66: 277-285.
- Eggers M, Radsak K, Enders G, Reschke M. 2001.** Use of recombinant glycoprotein antigens gB and gH for diagnosis of primary human cytomegalovirus infection during pregnancy. J Med Virol. 63: 135-142.

- Epstein MA, Henle G, Achong BG, Barr YM. 1965.** Morphological and biological studies on a virus in cultured Lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med.* 121: 761-770.
- Erice A. 1999.** Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 286-297.
- Fleckenstein B, Muller I, Collins J. 1982.** Cloning of the complete human cytomegalovirus genome in cosmids. *Gene* 18: 39-46.
- Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt LS, Katsafanas G, Roffman E, Danovich RM, June CH. 1990.** Isolation of a new herpesvirus from human CD4+T cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* 87: 748-752.
- Fried H, Kutay U. 2003.** Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 1659–1688.
- Fujisawa H, Morita M. 1997.** Phage DNA packaging. *Genes Cells* 2: 537–545.
- Geballe AP, Leach FS, Mocarski ES. 1986.** Regulation of cytomegalovirus late gene expression: gamma genes are controlled by posttranscriptional events. *J Virol.* 57: 864-874.
- Gelderblom HR, Hausmann EHS, Özel MA, Pauli MG, Koch MA. 1987.** Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 156: 171-176.
- Gibson W. 2001.** Action at the assemblin dimer interface. *Nat Struct Biol.* 8: 739-741.
- Gibson W. 1996.** Structure and assembly of the virion. *Intervirology* 39: 389-400. Review.
- Giesen K, Radsak K, Bogner E. 2000.** The potential terminase subunit pUL56 of HCMV is translocated into the nucleus by its own NLS and interacts with importin α . *J. Gen. Virol.* 81: 2231-2244.
- Giesen K, Radsak K, Bogner E. 2000a.** Targeting of the gene product encoded by ORF UL56 of human cytomegalovirus into viral replication centers. *FEBS Lett.* 471: 215-218.
- Godfrey A, Anderson J, Papanastasiou A, Takeuchi Y, Boshoff C. 2005.** Inhibiting primary effusion lymphoma by lentiviral vectors encoding short hairpin RNA. *Blood* 105: 2510-2518.
- Goldfarb DS, Corbett AH, Mason DA, Harreman MT, Adam SA. 2004.** Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol.* 14: 505-514. Review.

- Good SS, Owens BS, Townsend LB, Drach JC. 1994.** The disposition in rats and monkeys of 2-bromo-5,6-dichloro-1-(β -D-ribofuranosyl)-benzimidazole (BDCRB) and its 2,5,6-trichloro congener (TCRB). *Antivir. Res.* 23: 103.
- Gowen B, Bamford JK, Bamford DH, Fuller SD. 2003.** The tailless icosahedral membrane virus PRD1 localizes the proteins involved in genome packaging and injection at a unique vertex. *J Virol.* 77: 7863-7871.
- Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D. 1990.** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87: 4645-4649.
- Grundy JE, McKeating JA, Ward PJ, Sanderson AR, Griffiths PD. 1987.** Beta 2 microglobulin enhances the infectivity of cytomegalovirus and when bound to the virus enables class I HLA molecules to be used as a virus receptor. *J Gen Virol.* 68: 793-803.
- Guasch A, Pous J, Ibarra B, Gomis-Ruth FX, Valpuesta JM, Sousa N, Carrascosa JL, Coll M. 2002.** Detailed architecture of a DNA translocating machine: the high-resolution structure of the bacteriophage phi29 connector particle. *J Mol Biol.* 315: 663-676.
- Guo P, Erickson S, Xu W, Olson N, Baker TS, Anderson D. 1991.** Regulation of the phage phi 29 prohead shape and size by the portal vertex. *Virology* 183: 366-373.
- Guo S, Huang F, Guo P. 2006.** Construction of folate-conjugated pRNA of bacteriophage phi29 DNA packaging motor for delivery of chimeric siRNA to nasopharyngeal carcinoma cells. *Gene Ther.* 16 [Epub ahead of print].
- Guo P, Peterson C, Anderson D. 1987.** Prohead and DNA-gp3-dependent ATPase activity of the DNA packaging protein gp16 of bacteriophage phi 29. *J. Mol. Biol.* 197: 229-236.
- Hammond SM. 2005.** Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett.* 579: 5822-5829. Review.
- Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. 2001.** Post-transcriptional Gene Silencing by Double-stranded RNA. *Nature Rev. Gen.* 2: 110-119.
- Hitchcock MJM, Jaffe HS, Martin JC, Stagg RJ. 1996.** Cidofovir, a new agent with potent anti-herpesvirus activity. *Antivir. Chem. Chemother.* 7: 115-127.
- Hoppert M, Holzenburg A. 1998.** *Electron Microscopy in Microbiology.* Bios Scientific Publishers Ltd.
- Huang ES, Chen ST, Pagano JS. 1975.** Human Cytomegalovirus. Purification and Characterisation of viral DNA. *J of Virol.* 12: 1473-1481.

- Huber MT, Compton T. 1998.** The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *J Virol.* 72: 8191-8197.
- Hutvagner G, Zamore PD. 2002.** RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr. Opin. Genetics & Development.* 12: 225–232.
- Hwang JS, Bogner E. 2002.** ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *J Biol Chem.* 277: 6943-6948.
- Hwang JS, Kregler O, Drach JC, Townsend LB, Fischer A, Bogner E.** A new benzimidazole D-ribonucleoside inhibits ATPase activity of HCMV pUL56 and nuclear egress. *Eingereicht.*
- Irmiere A, Gibson W. 1983.** Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* 130: 118-133.
- Jiang W, Chang J, Jakana J, Weigele P, King J, Chiu W. 2006.** Structure of epsilon15 bacteriophage reveals genome organization and DNA packaging/injection apparatus. *Nature* 439: 612-616.
- Josephs SF, Salahddin SZ, Ablashi DV, Schachter F, Wong-Staal F, Gallo RC. 1986.** Genomic analysis of the Human B-Lymphotropic Virus (HBLV). *Science* 234: 601-603.
- Klemola E. 1973.** Cytomegalovirus infection in previously healthy adults. *Ann Intern. Med.* 79: 267-268.
- Kochan J, Carrascosa JL, Murialdo H. 1984.** Bacteriophage lambda preconnectors. Purification and structure. *J. Mol. Biol.* 174: 433-447.
- Komazin G, Townsend LB, Drach JC. 2004.** Role of a mutation in human cytomegalovirus gene UL104 in resistance to benzimidazole ribonucleosides. *J Virol.* 78: 710-715.
- Krosky PM, Baek MC, Coen DM. 2003.** The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress. *J Virol.* 77: 905-914.
- Krosky PM, Underwood MR, Turk SR, Feng KW, Jain RK, Ptak RG, Westerman AC, Biron KK, Townsend LB, Drach JC. 1998.** Resistance of human cytomegalovirus to benzimidazole ribonucleosides maps to two open reading frames: UL89 and UL56. *J Virol.* 72: 4721-4728.
- Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lalezari JP, Aberg JA, Wang LH, Wire MB, Miner R, Snowden W, Talarico CL, Shaw S, Jacobson MA, Drew WL. 2002.** Phase I dose escalation trial evaluating the pharmacokinetics, anti-human cytomegalovirus (HCMV)

- activity, and safety of 1263W94 in human immunodeficiency virus-infected men with asymptomatic HCMV shedding. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 2969-2976.
- Li L, Nelson JA, Britt WJ. 1997.** Glycoprotein H-related complexes of human cytomegalovirus: identification of a third protein in the gCIII complex. *J Virol.* 71: 3090-3097.
- Li BJ, Tang Q, Cheng D, Qin C, Xie FY, Wei Q, Xu J, Liu Y, Zheng BJ, Woodle MC, Zhong N, Lu PY. 2005.** Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat Med.* 11: 944-951.
- Liu B, Stinski MF. 1992.** Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 *cis*-acting elements. *J. Virol.* 66: 4434-4444.
- Lopper M, Compton T. 2004.** Coiled-coil domains in glycoproteins B and H are involved in human cytomegalovirus membrane fusion. *J Virol.* 78: 8333-8341.
- Lurain NS, Spafford LE, Thompson KD. 1994.** Mutation in the UL97 open reading frame of human cytomegalovirus strains resistant to ganciclovir. *J Virol.* 68: 4427-4431.
- Lurz R, Orlova EV, Gunther G, Dube P, Droge A, Weise F, van Heel M, Tavares P. 2001.** Structural organisation of the head-to-tail interface of a bacterial virus. *J. Mol. Biol.* 310: 1027-1037.
- Macara IG. 2001.** Transport into and out of the nucleus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 570–594.
- Mach M, Kropff B, Dal Monte P, Britt W. 2000.** Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *J Virol.* 74: 11881-11892.
- MacCormac LP, Grundy JE. 1999.** Two clinical isolates and the Toledo strain of cytomegalovirus contain endothelial cell tropic variants that are not present in the AD169, Towne, or Davis strains. *J Med Virol.* 57: 298-307.
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, DeWeese-Scott C, Geer LY, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH. 2005.** CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res.* 33: 192-196.
- Murakami M, Ota T, Nukuzuma S, Takegami T. 2005.** Inhibitory effect of RNAi on Japanese encephalitis virus replication in vitro and in vivo. *Microbiol Immunol.* 49: 1047-1056.

- Meyer GA, Radsak K. 2000.** Identifikation of a novel signal sequence that targets transmembrane proteins to the nuclear envelope inner membrane. *J Biol Chem.* 275: 3857-3866.
- Meyer HH, Ripalti A, Landini MP, Radsak K, Kern HF, Hensel GM. 1997.** Human cytomegalovirus late-phase maturation is blocked by stably expressed UL32 antisense mRNA in astrocytoma cells. *J. Gen. Virol.* 78: 2621-2631.
- Morris KV, Rossi JJ. 2006.** Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy. *Gene Ther.* [Epub ahead of print].
- Muller DJ, Engel A, Carrascosa JL, Velez M. 1997.** The bacteriophage Φ 29 head-tail connector imaged at high resolution with the atomic force microscope in buffer solution. *EMBO J.* 16: 2547-2553.
- Mullis KB, Faloona FA. 1987.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- Newcomb WW, Brown JC. 2002.** Inhibition of herpes simplex virus replication by WAY-150138: assembly of capsids depleted of the portal and terminase protein involved in DNA encapsidation, *J. Virol.* 76: 10084-10088.
- Newcomb WW, Homa FL, Thomsen DR, Booy FP, Trus BL, Steven AC, Spencer JV, and Brown JC. 1996.** Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid assembly. *J. Mol. Biol.* 263: 432-446.
- Newcomb WW, Juhas RM, Thomsen DR, Homa FL, Burch AD, Weller SK Brown JC. 2001.** The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *J. Virol.* 75: 10923-10932.
- Nykanen A, Haley B, Zamore PD. 2001.** ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107: 309–321.
- Ogawa-Goto K, Tanaka K, Gibson W, Moriishi E, Miura Y, Kurata T, Irie S, Sata T. 2003.** Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J Virol.* 77: 8541-8547.
- Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U, Helenius A. 2000.** Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol.* 20: 4922-4931.
- Orlova EV, Gowen B, Droge A, Stiege A, Weise F, Lurz R, van Heel M, Tavares P. 2003.** Structure of a viral DNA gatekeeper at 10 Å resolution by cryo-electron microscopy. *EMBO J.* 22: 1255-1262.
- Palacios I, Hetzer M, Adam SA, Mattaj IW. 1997.** Nuclear import of U SnRNPs requires importin beta. *EMBO J.* 16: 6783-6792.

- Paraskeva E, Izaurralde E, Bischoff FR, Huber J, Kutay U, Hartmann E, Luhrmann R, Gorlich D. 1999.** CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J. Cell Biol.* 145: 255-264.
- Pass RF. 2001.** Cytomegalovirus. In Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Martin, M. A., Lamb, R. A., Roizman, B. und Straus, S. E. *Fields Virology*, 4. Edition, New York Raven Press.: 2675-2705.
- Patel AH, Rixon FJ, Cunningham C, Davison AJ. 1996.** Isolation and characterization of a herpes simplex virus type-1 mutant defective in the UL6 gene. *Virology* 217: 111-123.
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. 1993.** Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8392-8396.
- Penfold ME, Mocarski ES. 1997.** Formation of cytomegalovirus DNA replication compartments defined by localization of viral proteins and DNA synthesis. *Virology* 239: 46-61.
- Prevelige PE, Thomas D, King J. 1993.** Nucleation and growth phases in the polymerization of coat and scaffolding subunits into icosahedral procapsid shells. *Biophys. J.* 64: 824-835.
- Radsak K, Brucher KH, Britt W, Shiou H, Schneider D, Kollert A. 1990.** Nuclear compartmentation of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Virology* 177: 515-522.
- Radsak K, Brucher KH, Georgatos SD. 1991.** Focal nuclear envelope lesions and specific nuclear lamin A/C dephosphorylation during infection with human cytomegalovirus. *Eur J Cell Biol.* 54: 299-304.
- Radsak K, Eickmann M, Mockenhaupt T, Bogner E, Kern H, Eis-Hubinger A, Reschke M. 1996.** Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch Virol.* 141: 557-572.
- Radsak K, Kern H, Reis B, Reschke M, Mockenhaupt T, Eickmann M. 1995.** Aspects of viral morphogenesis and of processing and transport of viral glycoproteins. in: Friedman, H. and Barbanti-Brodano, G. (eds.): *DNA Tumor Viruses: Oncogenic Mechanisms*, Plenum Press, N.Y.: 295-312.
- Reschke M, Reis B, Noding K, Rohsiepe D, Richter A, Mockenhaupt T, Garten W, Radsak K. 1995.** Constitutive expression of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) with mutagenized carboxy-terminal hydrophobic domains. *J Gen Virol.* 76: 113-122.
- Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Lilleri D, Gorini G, Gerna G. 2002.** Diagnosis and outcome of preconceptional and periconceptional primary human cytomegalovirus infections. *J Infect Dis.* 186: 553-557.

- Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C. 1991.** Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64: 615-623.
- Roizmann B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. 1992.** The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol.* 123: 425-449. Review.
- Rowshani AT, Bemelman FJ, van Leeuwen EM, van Lier RA, ten Berge IJ. 2005.** Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 79: 381-386. Review.
- Rowe WP, Hartley JW, Waterman S, Turner HC, Huebner RJ. 1956.** Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc. Exp Biol Med* 92: 418-424.
- Sanchez V, Greis KD, Sztul E, Britt WJ. 2000.** Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *J Virol.* 74: 975-986.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74: 5463-5467.
- Sarov I, Abady I. 1975.** The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirions and dense bodies. *Virology* 66: 464-473.
- Savva CG, Holzenburg A, Bogner E. 2004.** Insights into the structure of human cytomegalovirus large terminase subunit pUL56. *FEBS Lett.* 563: 135-140.
- Scheffczik H, Savva CG, Holzenburg A, Kolesnikova L, Bogner E. 2002.** The terminase subunits pUL56 and pUL89 of human cytomegalovirus are DNA-metabolizing proteins with toroidal structure. *Nucleic Acids Res.* 30: 1695-1703.
- Schleiss MR, Heineman TC. 2005.** Progress toward an elusive goal: current status of cytomegalovirus vaccines. *Expert Rev Vaccines* 4: 381-406.
- Schneeweis KE. 1962.** Serologische Untersuchungen zur Typendifferenzierung des Herpesvirus Hominis. *Z Immunitätsforsch Exp Ther.* 124: 24-48.
- Scholz B, Rechter S, Drach JC, Townsend LB, Bogner E. 2003.** Identification of the ATP-binding site in the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *Nucleic Acids Res.* 31: 1426-1433.
- Sharp PA. 2001.** RNA Interference. *Genes Dev.* 15: 485-490.

- Sheaffer AK, Newcomb WW, Gao M, Yu D, Weller SK, Brown JC, Tenney DJ. 2001.** Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging proteins associate with the procapsid prior to its maturation. *J. Virol.* 75: 687-698.
- Shibata H, Fujisawa H, Minagawa T. 1987.** Characterization of the bacteriophage T3 DNA packaging reaction *in vitro* in a defined system. *J. Mol. Biol.* 196: 845-851.
- Simpson AA, Tao Y, Leiman PG, Badasso MO, He Y, Jardine PJ, Olson NH, Morais MC, Grimes S, Anderson DL, Baker TS, Rossmann MG. 2000.** Structure of the bacteriophage phi29 DNA packaging motor. *Nature* 408: 745-750.
- Sinzger C, Kahl M, Laib K, Klingel K, Rieger P, Plachter B, Jahn G. 2000.** Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *J. Gen. Virol.* 81: 3021-3035
- Smith MG. 1956.** Propagation in tissue cultures of a cythopathogenic virus from human Salivary Gland Virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol.* 92: 424-430.
- Smith DE, Tans SJ, Smith SB, Grimes S, Anderson DL, Bustamante C. 2001.** The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature* 413: 748-752.
- Sober HA. 1968.** CRC Handbook of Biochemistry, Selected Data for Molecular Biology.
- Sodeik, B, Ebershold MW, Helenius A. 1997.** Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol.* 136: 1007-1021.
- Spaete RR, Mocarski ES. 1985.** The α sequence of the cytomegalovirus genome functions as a cleavage/packaging signal for herpes simplex virus defective genomes. *J. Virol.* 54: 817-824
- Spaete RR, Mocarski ES. 1985b.** Regulation of cytomegalovirus gene expression: alpha and beta promoters are trans activated by viral functions in permissive human fibroblasts. *J Virol.* 56: 135-143.
- Steven AC, Heymann JB, Cheng N, Trus BL, Conway JF. 2005.** Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Curr Opin Struct Biol.* 15: 227-236. Review.
- Stinski MF, Thomsen DR, Stenberg RM, Goldstein LC. 1983.** Organization and expression of the immediate early genes of human cytomegalovirus. *J Virol.* 46: 1-14.

- Stinski MF, Thomson DR, Wathen MN. 1981.** Structure and Function of the cytomegalovirus genome. In *The Human Herpesviruses*. Edited by Nahamias SJ, Dowle WR, Schinazi RF. An interdisciplinary perspective, Elsevier, New York.
- Studier FW, Moffatt BA. 1986.** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-130.
- Tavares P, Lurz R, Stiege A, Ruckert B, Trautner BA. 1996.** Sequential headful packaging and fate of the cleaved DNA ends in bacteriophage SPP1. *J. Mol. Biol.* 264: 954-967.
- Thurlow JK, Murphy M, Stow ND, Preston VG. 2006.** Herpes Simplex Virus Type 1 DNA-Packaging Protein UL17 Is Required for Efficient Binding of UL25 to Capsids. *J Virol.* 80: 2118-2126.
- Tooze J, Holinshead M, Reis B, Radsak K, and Kern H. 1993.** Progeny vaccinia and Human Cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol.* 60: 163-178.
- Trus BL, Cheng N, Newcomb WW, Homa FL, Brown JC, Steven AC. 2004.** Structure and polymorphism of the UL6 portal protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 78: 12668-12671.
- Valentine R, Shapiro C, Stadtman ER. 1968.** Regulation of glutamine synthetase. XII. Electron microscopy of the enzyme from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 7: 2143-2152.
- van Zeijl M, Fairhurst J, Jones TR, Vernon SK, Morin J, LaRocque J, Feld B, O'Hara B, Bloom JD, Johann SV. 2000.** Novel class of thiourea compounds that inhibit herpes simplex virus type 1 DNA cleavage and encapsidation: resistance maps to the UL6 gene. *J Virol.* 74: 9054-9061.
- Wang X, Huang DY, Huong SM, Huang ES. 2005.** Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat Med.* 11: 515-521.
- Wang X, Huong SM, Chiu ML, Raab-Traub N, Huang ES. 2003.** Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* 424: 456-461.
- Wathen MW, Stinski MF. 1982.** Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early, and late times after infection. *J Virol.* 41: 462-477.
- Welch AR, Woods AS, McNally LM, Cotter RJ, Gibson W. 1991.** A herpesvirus maturational protease, assemblin: identification of its gene, putative active site domain, and cleavage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10792-10796.
- White CA, Stow ND, Patel AH, Hughes M, Preston VG. 2003.** Herpes simplex virus type 1 portal protein UL6 interacts with the putative terminase subunits UL15 and UL28. *J Virol.* 77: 6351-6358.

- Wiebusch L, Truss M, Hagemeier C. 2004.** Inhibition of human cytomegalovirus replication by small interfering RNAs. *J Gen Virol* 85: 179-184.
- Winkler M, Schmolke S, Plachter B, Stamminger T. 1995.** The pUL69 protein of human cytomegalovirus (HCMV), a homologue of the herpes simplex virus ICP27, is contained within the tegument of virions and activates the major immediate-early enhancer of HCMV in synergy with the tegument protein pp71 (ppUL82). *Scand J. Infect. Dis. Suppl.* 99: 8-9.
- Wright HT Jrm, Goodheart CR, Lielausis A. 1964.** Human Cytomegalovirus. Morphology by negative staining. *Virology* 23: 419-424.
- Wu CJ, Chan YL. 2006.** Antiviral applications of RNAi for coronavirus. *Expert Opin Investig Drugs* 15: 89-97.
- Yamamoto, T, Suzuki S, Radsak K, Hirai K. 1998.** The UL112/113 gene products of human cytomegalovirus which colocalize with viral DNA in infected cell nuclei are related to efficient viral DNA replication. *Virus Res.* 56:107-114.
- Yu D, Silva MC, Shenk T. 2003.** Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(: 12396-401.
- Zipper P, Kratky O, Herrmann R, Hohn T. 1971.** An x-ray small angle study of the bacteriophage fr and R17. *Eur. J. Biochem.* 18: 1-9.

9. Anhang

9.1 Abkürzungen

Å	Angström
<i>aqua dest</i>	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
Ci	Curie $\equiv 2,22 \times 10^{12}$ radioaktive Zerfälle/ Minute
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
C-terminal	Carboxy-terminal
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]Octan
DMEM	Dulbeccos minimales, essentielles Medium
dNTPs	Desoxynucleotide
ds	Doppelstrang, doppelsträngig
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FCS	Fötales Kälberserum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
gp	Glycoproteine
GST	Glutathion S-Transferase
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HFF	Humane Vorhautfibroblasten
h.p.i.	Stunden nach Infektion
IC ₅₀	Konzentration zur 50%igen Inhibition
IE	<i>immediate early</i>
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-βD-Thiogalaktosid
IR	<i>internal repeat</i>
IU	infektiöse Einheiten
kb	Kilobasenpaare

kDa	Kilodalton
lyt	lytisch
MCP	<i>major capsid protein</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MNA	1-methyl-5-norbornene-2,3-dicarboxylic acid anhydride, methylnadic anhydride
mock	nicht infiziert
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
N-terminal	Amino-terminal
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
ORF	offener Leserahmen
ori	<i>origin of replication</i> , Replikationsursprung
PAA	Phosphonoessigsäure
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PAS	Protein A-Sepharose
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pp	Phosphoproteine
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TR	<i>terminal repeat</i>
üN	über Nacht
UL/US	<i>unique long/ unique short</i>
UV	ultraviolett
VT	Volumenteil
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

9.2 Basenpaar-Sequenz des ORF UL104

atggagcgaaaccactggaacgaaaaatcctcgggcgcaaaagcgctcgcgcgagagggacttgacctgtgcgacg tacctcgcttttggtgaccttgctttttaggagcccgctttcgcgcgagcgctctccctgaactggaacagctgc	Basenpaare 1 - 75
atccgttcgatcttggcggccgacgagaggttgaggatcaaggcgctcgctgacttggcggtggcgccgcgcgctg taggcaagctagaaccgcccggctgctctccaactcctagttccgcgacgacatgaaccgcaccgcgccgcgac	Basenpaare 76 - 150
gatgacgagggcgctcatcgacattttcccccacggggcagacgatgagcttccctgcgggttctgcacggctttctg ctactgctccggcagtagctgtaaaaggggtgccccgctgctactcgaaggacgccaacgacgtgccgaaagac	Basenpaare 151 - 225
gggacgtgtcgcggccaaagcatgcaccaggtgctgcgcgacccgtgctgctgcgcaagcagctgctctacgga ccctgcacagcgccgggtttcgtacgtggtccacgacgcgctgggcacgcacgacgcgttcgtcgacgagatgcct	Basenpaare 226 - 300
gtgtgcaaaacgctctttgacaccatcacgggtgcggcgctggccgaggagtggaaagttgcacgcggcgctattt cacacgttttgcgagaaaactgtggtagtccacgcgcgcgacccgctcctcaccttcaacgtgcgcgcgataaa	Basenpaare 301 - 375
ccctaccgcgcgctggacgaagaggacctggagcagtatctgttggtgtggagcgctcgttgcgcagagcgctg gggatggcgcgacacctgcttctcctggacctcgtcatagacaaccacacctcgcggagcaacgcggctctgcac	Basenpaare 376 - 450
caaacggcgctgctggcgccctccgcgacattttatatcagtagccgataacgacgactatggtctctacgtg gtttgcccgacgacccgcggaggcgctgtaaaatatagtcagtcggctattgctgctgataccagagatgcac	Basenpaare 451 - 525
gattggtgcgtaacgggtgggactggtaccgctgctggacgtgaagaccaagccgagcgaggcgccgagcgggcg ctaaccacgcattgccaccctgacatggcgacacctgcacttctggttcggctcgctccgcggctcgcgccg	Basenpaare 526 - 600
caatttgcacgcggcgctgcagcggggccaccgagacacaccgctggcgaggacctgctgcaggctaacctg gttaaacatgcgcgcggcgacgtcgcccggtggtctctgtgtggcgacccgctcctggacgacgtccgattggac	Basenpaare 601 - 675
gcgctgctgctgcaggtggcgagcgccctggcgccgctgcgcgtagccaacgcgcccaggtacgcgtcttcaag cgcgacgacgacgtccaccggctcgcggaaccgcggcgacgcgcatcggttgcgcgggctccatgcgcagaagttc	Basenpaare 676 - 750
aaggtgcgctcggagcggtggaggcgagctgcgcggcaagcacatccgcttgtagctggcgccgaaccgctg ttccacgcgagcctcgccgacctccgcgtcgacgcgcgcttcgtgtaggcgaacatgcaccgcggcttgccgac	Basenpaare 751 - 825
gcttatgagcgcgacaagctgctgttcaccacgcgggtggcacacctgcacgaggagattctgcgctacgacggg cgaatactcgcgctgttcgacgacaagtggtgcggccacctgtggacgtgctcctctaagacgcgatgctgcc	Basenpaare 826 - 900
ctctgccgccacaaaagatctgccagttgctcaatacctttcctgtgaaagtggtagccgccagccgccacgag gagacggcggtggttttttagacggtcaacgagttatgaaaggacactttcaccactggcggtcgcggtgctc	Basenpaare 901 - 975
ctcaactgcaagaagctggtggagatgatggagcagcacgacggggcagcgacgcaaaaagtcattatgaag gagttgacgttcttcgaccacctctactacctcgtcgtgctggccccgctcgctgcggtttttcaggtaatacttc	Basenpaare 976 - 1050
tttttgcttaacgtctcggacagcaaatacgcgcatcgccatcgaggacagcgtcgagtcctttctgcaggacctg aaaaacgaattgcagagcctgctgttttagcgcgtagccgtagctcctgtcgcagctcaggaaagacgtcctggac	Basenpaare 1051-1125
acccctcgctggtggacaaaaccgtctactaccgcgcgctggtccggcggaaccggcgctggtgggacccggc tgggggagcgaccacctggttttggcagatgatggcgcgccaccaggcccgctgggcccaccacctgggccc	Basenpaare 1126-1200
ggcgccgtggtgggaggaccgcggggccacgtcgggctgctgccgcgcaccggcgccggcgcccgagcg ccgcggcaccacctcctggcgcccggtgcagcccgacgacgcgcggtggcgccggcgcccgggctcgcc	Basenpaare 1201-1275
gacatccgcgacctgtttaagaagcaggttatcaagtgcctggaggagcagatccagtcgaggtggacgagatc ctgtaggcgctggacaaattcttcgtccaatagttcacggacctcctcgtctaggtcagcgtccacctgctctag	Basenpaare 1276-1350
caggacctgcgcacgcttaaccagacctgggagaatcgctgcgcgaactgcgcgacctgctcacgcgctacgcc gtcctggacgcgtgcgaattggtctggacctcttagcgcacgcgcttgacgcgctggacgagtgcgcgatgcgg	Basenpaare 1351-1425
tcgcgccgcgaggactccatgagcctggcgcgcgacgcgcgaactctaccacctgcccggtgtggaggccgtg agcgccgcgctcctgaggtactcggaccgcgcgcgctcgggcttgagatggtggacgggcacaaacctccggcac	Basenpaare 1426-1500
cgcaaggcgcgacgcggcgccctccgtccgctggcggtggaagacaaccgcctggtggccaacagcttcttc gcgttcgcgcgctgcgcgcgggaaggcaggcaccgccacctctgttggcggaccaccgggtgtcgaagaag	Basenpaare 1501-1575
tcgcagttcgtgccggcaccgagtcgctggaacgcttccctcacgcagttgtgggaaaacgagtatctccgtacc agcgtcaagcacggggcggtggctcagcgaccttgcaaggagtgctcaacaccttttgctcataaaggcatgg	Basenpaare 1576-1650
tttcgctcagcgctggtcacgcatcaagggccgaaggccatcgtctactccaattacagggtagagcgc aaagcggatgccgcagaccagtgctagtccccggcttctccggtagcagatgaggttaatgtccatctcgcg	Basenpaare 1651-1725
gtgacctgcacctatctgtgtcacatcctggcgctgggcacgctggaccccgtagccgaggcctacctgcagctc cactgggacgggtagacacagtgtaggaccgcgacctgacgacctggggcatgggctcggatggacgtcgag	Basenpaare 1726-1800

```

tccttcggcgagatcgtggccgcgcctacgacgacagcaagttttgccgatacgtggagctgatttgcagccgc Basenpaare
aggaagccgctctagcaccggcgccggatgctgctgctgttcaaaacggctatgcacctcgactaaacgtcggcg 1801-1875

gagaaggcgcgctcggcgccaaatgagccgcgaagcggcgccggagtgccagaaaggggaactgcctcgagccgc Basenpaare
ctcttcgcgcagccgcggtttactcggcgcttcgccgcccgcctcaggtctttccccttgacggagctcgcg 1876-1950

ggcccaggaacacttgaaagggtccgcgcgcgcgcttgatcacggcagacgaggagcggcgccgcccagagcgt Basenpaare
ccgggtccttgtaactttccagcgcgccgcccgaactagtgcgctgctcctcgccgcgcgggtctcgca 1951-2025

gtcggccgatttcgaaatggaggccctgatgatccgcggcgctgctggaggtccatacggatttctactag Basenpaare
cagccggctaaagctttacctccgggactactagcgccgcacgacctccaggtatgcctaaagtgtac 2026-2094

```

9.3 Aminosäure-Vergleich von pUL104 mit HSV-1 pUL6

Sequenzvergleich HCMV pUL104 (query) mit HSV-1 pUL6 (sbjct) nach BLAST-search (NCBI)
 CD-Length = 540 residues, 95.0% aligned
 Score = 535 bits (1381), Expect = 1e-153

```

Query: 65 MSFLRLLHGFGLGTCRGQSMHQVLRDPCVLRKQLLYGVCKTLFDTITVRRVAEEWKLHAAL 124
Sbjct: 1 MLFFEILHGKYGYVKGQTIYSSLRSSGVFSRQLFYTYLYKTALNSCTYEDVAADWQKHEAA 60

Query: 125 FPYRALD-----EEDLEQYLLVWSASLRQSVQTVLGGRLRDILYQYADNDDYGLYVDWCV 179
Sbjct: 61 IAARWKKSGAEASRFAESTFDSWRQTLKMTLLDLVLGIINCILYSG-ANASYERYVDWIV 119

Query: 180 TVGLVPLLDVKTTPSEAAERAQFVRAAVQRATET-HPLAQDLLQANLALLLQVAERLGAV 238
Sbjct: 120 TLGLVPV--VRRPPNAKTVRSLASQLSAAVLSGALLKVARSLRAGLAEVTELLECLSSV 177

Query: 239 RVANAPEVRVFKKVRSERLEAQLRGKHIRLYVAAEPLAYERDKLLFTTPVAHLHHEILRY 298
Sbjct: 178 YIPDYDEVSIYYNYSRGEIVARYTGKRIECEVLWPPVIIGGR-VLFDSPVQRLFGEVMAC 236

Query: 299 DGLCRHQKICQLLNTFPVKVVTASRHELNCKKLVEEMEQHGRGSDAKKSIMKFLNVSIDS 358
Sbjct: 237 HRLREHAKLCQLLNTAPVKVLVGSADSNVYKDILKHLEENKASDAKKELLKLLVNLKEN 296

Query: 359 KSRIGIEDSVESFLQDLTPSLVDQNR-----PERDIRDLFKKQVICKLEEQI 405
Sbjct: 297 KTVGGITDVVESFLTDVSNLVDNRNKLFGAGGEGGARPTTQQALRKQVSNKINCKLEEQI 356

Query: 406 QSQVDEIQDLRLNQTWENRVRELRLDLLTRYASRREDSMSLGARDAELYHLPVLEAVRKA 465
Sbjct: 357 NNQFDTIEDLKKENELLLKKLRELESELRRLPQAAADK-SGAGDSNLLTLSTLEALNKL 415

Query: 466 RDA-APFRPLAVEDNRLVANSFFSQFVPGTESLERFLTQLWENEYFRTRFLRLRVTHQGA 524
Sbjct: 416 QDSELIDTSVSVGDDRYVANSFFSQYIPPYREDDKRLTRLWESELFRTFKLRPVVNNQGG 475

Query: 525 EEAIVYSNYTVERVTLPYLCHILALGTLDPVPEAYLQL 562
Sbjct: 476 ELSVSYSNDTISLLLGFFTYSILRLRLRELITESYVSL 513

```

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung der vorliegenden Dissertation unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K. Radsak für die Bereitschaft, die vorliegende Arbeit vor dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg zu vertreten, bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. B. Fleckenstein bedanke ich mich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Promotionsarbeit am Institut für klinische und molekulare Virologie der Universität Erlangen-Nürnberg.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. E. Bogner für die Bereitstellung des interessanten und vielseitigen Themas, die engagierte fachliche Betreuung, die Bereitschaft zu zahlreichen anregenden Diskussionen und für die experimentellen Hilfestellungen.

Brigitte Scholz, Manuela Rieger, Jae-Seon Hwang, Corina Thoma und Oliver Kregler danke ich für ihre Unterstützung und die angenehme und interessante Arbeitsatmosphäre. Ohne sie hätte das ganze nicht halb so viel Spaß gemacht.

Außerdem möchte ich Anke Fischer vom Institut für Anatomie II der Universität Erlangen-Nürnberg für ihre Unterstützung bei der Anfertigung von Ultra-Dünnschnitten für die Elektronenmikroskopie danken.

Mein persönlichster Dank gilt meinen Eltern, die mich während meiner Dissertation unterstützt und motiviert haben. Sie waren ein Ruhepunkt, auf den ich mich immer stützen konnte.

Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer im Studiengang der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller, Daut, Dressler, Elsässer, Garten, Gudermann, Hartmann, Hasilik, Heeg, Jungclas, Kaiser, Kern, Kirchner, Klenk, Koolman, Lammel, Lill, Löffler, Moll, Niessing, Perst, Radsak, Röhm, Tampé, Schäfer, Schulz, Schwaeble, Seitz, Stöckmann, Suske.